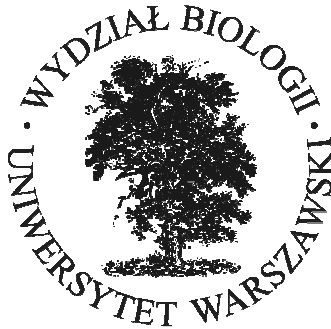


Uniwersytet Warszawski  
Wydział Biologii



Piotr Maszczyk  
Nr albumu: 192689

# Rozmieszczenie idealnie swobodne *Daphnia* w gradiencie obfitości pokarmu i w gradiencie niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy – ryby planktonożerne

Rozprawa doktorska  
w zakresie nauk biologicznych  
dyscyplinie ekologii

Praca wykonana pod kierunkiem  
Prof. dr hab. Z. Macieja Gliwicza  
Zakład Hydrobiologii, Wydział Biologii  
Uniwersytet Warszawski

Warszawa, kwiecień 2016

*Oświadczenie kierującego pracą*

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie ekologii.

Data

Podpis kierującego pracą

*Oświadczenie autora pracy*

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia doktora w innej jednostce.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

### **Słowa kluczowe**

*Daphnia*, dostosowanie, kompromis, model symulacyjny, odpowiedź funkcjonalna, rozmieszczenie idealnie swobodne, ryba planktonożerna, śmiertelność, tempo wzrostu, zagęszczenie populacji

### **Tytuł pracy w języku angielskim**

Ideal free distribution of *Daphnia* in the water column in the gradients of resources and risk to predation by planktivorous fish

*Osobom, które wniosły znaczący wkład w powstanie i kształt tej pracy, składam serdeczne podziękowania.*

*Szczególnie dziękuję:*

*prof. Maciejowi Gliwiczowi za naukę artykułowania myśli, zarówno w mowie, jak i w piśmie;*

*Annie Hankiewicz, Elżbiecie Minkowskiej, Jackowi Radzikowskiemu, dr. hab. Mirkowi Ślusarczykowi, Ewie Babkiewicz, Marcinowi Tomasiakowi i pozostałym pracownikom i studentom Zakładu Hydrobiologii UW za życzliwość;*

*Marcie Czarnockiej-Cieciurze za współpracę przy konstrukcji modelu symulacyjnego;*

*Ewie Babkiewicz i Annie Hankiewicz za pomoc przy realizacji eksperymentów rzeczywistych;*

*Markowi Januszewskiemu, dr. hab. Mirkowi Ślusarczykowi, dr. Markowi Ostrowskiemu, Czesławowi Minkowskiemu, Andrzejowi Karwaczowi za pomoc techniczną;*

*Marcie Czarnockiej-Cieciurze, dr. Mirosławie Sokół, dr. hab. Pawłowi Koperskiemu, dr. Tomaszowi Wyszomirskiemu za pomoc w analizie statystycznej;*

*dr. Maciejowi Bartosiewiczowi, prof. Maciejowi Gliwiczowi, prof. Janowi Kozłowskiemu, prof. Waynowi Wurtsbaugh'owi, prof. Dariuszowi Wrzosekowi, dr. Tomaszowi Wyszomirskiemu za współpracę uwieńczoną wspólnymi publikacjami.*

Praca finansowana z grantów:

1. PRELUDIUM, NCN, 2014/13/N/NZ8/02462 (2014 - 2018, P. Maszczyk - kierownik)
2. ETIUDA, NCN, 2014/12/T/NZ8/00287 (2014 - 2015, P. Maszczyk - kierownik)
3. OPUS, NCN, 2011/03/B/NZ8/02093 (2012 - 2015, P. Maszczyk - wykonawca)
4. Własny, MNiSW, N N304 067336 (2009 - 2012, P. Maszczyk - kierownik)



## Streszczenie

Pionowe rozmieszczenie zwierząt planktonowych w słupie wody jeziora czy oceanu jest z reguły nierównomierne. Na ogół ta nierównomierność wyjaśniana jest indywidualnymi zachowaniami osobników zmierzających do optymalizacji położenia pionowego ze względu na szanse przeżycia i zysk energetyczny netto. W literaturze przedmiotu dotyczącej zwierząt planktonowych opisane są liczne przykłady prac eksperymentalnych, które dostarczają jedynie jakościowych (opisowych) dowodów potwierdzających słuszność tego wyjaśnienia. Dowody ilościowe są natomiast mniej liczne i sprowadzały się dotychczas jedynie do wygenerowania wirtualnych rozmieszczeń otrzymanych w wyniku wyliczeń matematycznych na podstawie założeń optymalizacyjnego modelu matematycznego bez eksperymentalnej weryfikacji ich prognoz.

Celem badań w ramach rozprawy była weryfikacja hipotezy "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji" postulującej, że rozmieszczenie pionowe osobników w populacji modelowego zwierzęcia planktonowego takiego, jak wioślarka z rodzaju *Daphnia*, w różnych kombinacjach gradientów cech środowiska, wynika z indywidualnych zachowań zmierzających do optymalizacji głębokości wybranej przez osobnika, na której odnajduje on największe szanse przeżycia i najwyższe tempo wzrostu. Miejsce to zależy od wielkości ciała osobnika, zagęszczenia jego populacji i od wiedzy o przestrzennym zróżnicowaniu potencjalnego tempa wzrostu i o przestrzennym zróżnicowaniu potencjalnego ryzyka śmierci. Hipoteza została zweryfikowana w każdej z czterech kombinacji dwóch gradientów, tj. w obecności lub w nieobecności gradientu pokarmu z maksimum jego stężenia w warstwach przypowierzchniowych i gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy - ryby planktonożernejszej posługującej się wzrokiem przy lokalizacji ofiary, w gradiencie natężenia i spektrum światła. Weryfikacja hipotezy polegała na porównaniu rzeczywistego rozmieszczenia *Daphnia* (młodych i dojrzałych) w różnych zagęszczeniach ich populacji otrzymanego w eksperymentach rzeczywistych z rozmieszczeniem teoretycznym otrzymanym w symulacjach wygenerowanych na podstawie czterech wersji założeń modelu optymalizacyjnego (napisanego w języku programowania NetLogo), opartego na założeniach koncepcji interferencyjnego rozmieszczenia idealnie swobodnego z uwzględnieniem kosztów (*IIFDC*), w warunkach odzwierciedlających warunki w eksperymencie rzeczywistym. Wersje modelu różniły się każdą możliwą kombinacją dwóch założeń, po pierwsze, że kształt odpowiedzi funkcjonalnej ryby (zależności tempa

konsumpcji młodych lub dojrzałych *Daphnia* od zagęszczenia ich populacji) jest zgodny z przebiegiem II lub III typu oraz, po drugie, że każdy osobnik *Daphnia* ma kompletną lub niekompletną wiedzę o potencjalnym tempie wzrostu i potencjalnym ryzyku śmierci na każdej głębokości. Hipoteza zostałaby potwierdzona, kiedy rozmieszczenia rzeczywiste okazałyby się podobne do rozmieszczeń wygenerowanych w symulacjach na podstawie założeń przynajmniej jednej z czterech wersji modelu.

Hipoteza została zweryfikowana dla *D. longispina* (typowego jeziornego gatunku wioślarki współwystępującej z rybą planktonożerną) poprzez: **(1)** ustalenie i ujednolicenie warunków w eksperymentach wirtualnych i rzeczywistych; **(2)** skonstruowanie modelu symulacyjnego; **(3)** konstrukcję trzech kolejno udoskonalanych układów eksperymentalnych niezbędnych dla badania rozmieszczenia zwierząt planktonowych (od „układu poziomego”, przez „wstępny układ pionowy” do „właściwego układu pionowego”); **(4)** przeprowadzenie eksperymentów laboratoryjnych dla parametryzacji modelu polegających na oszacowaniu **(a)** zależności indywidualnego tempa wzrostu od stężenia pokarmu glonowego, zagęszczenia populacji *Daphnia*, wieku osobnika oraz od natężenia światła, **(b)** spowolnienia tempa wzrostu *Daphnia* (młodych i dojrzałych) w gradiencie pokarmu w wyniku braku perfekcyjnej wiedzy o zasobności każdego miejsca, **(c)** zależności odległości reakcji ryby planktonożernej (względem każdej z dwóch klas wiekowych) od natężenia i składu spektralnego światła, **(d)** zależności ryzyka śmierci *per capita* ze strony ryby planktonożernej od zagęszczenia populacji planktonowej ofiary (młodych lub dojrzałych osobników), w każdej z czterech grup eksperymentów (a, b, c i d) korzystając z innego układu eksperymentalnego (odpowiednio: „komór przepływowych Lamperta” dla a, finalnej wersji układu eksperymentalnego dla badania rozmieszczenia zooplanktonu złożonego z dwóch 1-metrowej wysokości pionowych kolumn dla b, układu eksperymentalnego skonstruowanego dla obserwacji zachowań pokarmowych ryb żerujących w stałym zagęszczeniu planktonowych ofiar dla c oraz dużego układu eksperymentalnego złożonego z dwóch zestawów po dziesięć 200-litrowych zbiorników połączonych w okrąg, aby umożliwić swobodne przemieszczanie się ryb między nimi dla d); **(5)** wygenerowanie rozmieszczeń wirtualnych *Daphnia* w symulacjach dla każdej z czterech wersji założeń modelowych (uwzględniających II lub III typ odpowiedzi funkcjonalnej dla *Daphnia* „bezbłędnej” lub popełniającej błędy; **(6)** przeprowadzenie eksperymentów laboratoryjnych (we właściwym układzie pionowym dla badania rozmieszczenia *Daphnia*) w takich samych warunkach środowiska eksperymentalnego, i dla tych samych klas wiekowych *Daphnia*, co w eksperymentach wirtualnych; **(7)** skonfrontowanie ze sobą rozmieszczeń *Daphnia* w eksperymentach rzeczywistych z ich

rozmieszczeniami w eksperymentach wirtualnych wygenerowanych na podstawie założeń każdej z czterech wersji założeń modelowych.

Wyniki otrzymane w ramach realizacji rozprawy nie potwierdziły jednoznacznie prawdziwości hipotezy "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji", ponieważ tylko w niektórych sytuacjach (w obydwu nakładających się na siebie gradientach dla obydwu klas wiekowych oraz w gradiencie pokarmu jedynie dla osobników dojrzałych) wyniki średnich i rozkładów głębokości występowania *Daphnia* w stanie ostatecznie ukształtowanej równowagi w ich rozmieszczeniu otrzymanych w eksperymentach rzeczywistych pokryły się z wynikami otrzymanymi w symulacjach. Najlepsze dopasowanie rozkładów stwierdzono dla symulacji wygenerowanych na podstawie scenariusza zakładającego, że przebieg ryzyka śmierci wraz z zagęszczeniem populacji ofiary jest zgodny z typem III odpowiedzi funkcjonalnej i że *Daphnia* popełniają błędy w szacowaniu tempa wzrostu i ryzyka śmierci ze strony drapieżcy. Obserwacja wyboru głębokości pojedynczych osobników wykazała, że *Daphnia*, szczególnie osobniki dojrzałe, nawet w stanie ostatecznie ukształtowanej równowagi w ich rozmieszczeniu, pozostawały w ciągłym ruchu, z tym, że ich ruchliwość była najmniejsza w samym gradiencie pokarmu. Największa ruchliwość była natomiast w obydwu nakładających się na siebie gradientach, choć ruch ten był relatywnie (w stosunku do pozostałych wariantów) w niewielkim zakresie głębokości.

Wydaje się, że różnice w średnich głębokościach (i w rozkładach) w eksperymentach rzeczywistych i w eksperymentach wirtualnych w gradiencie pokarmu u młodych osobników mogą wynikać z przeszacowania znaczenia błędu w szacowaniu stężenia pokarmu przez osobniki młode, wyznaczonego w eksperymentach dla parametryzacji modelu. Natomiast najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem tłumaczącym to, że osobniki każdej z dwóch klas wiekowych przebywały bliżej powierzchni w eksperymentach rzeczywistych (niż w symulacjach) w wariantach w nieobecności gradientu pokarmu (w obecności i w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie) jest istnienie, nieuwzględnionej w założeniach modelowych „pamięci ewolucyjnej” tj. dodatkowej motywacji *Daphnia* do płynięcia w kierunku warstw przypowierzchniowych (które są na ogół najbardziej zasobne w pokarm), szczególnie wtedy, gdy na głębokości, na której znajduje się osobnik, jest niskie stężenie pokarmu.

Wyniki otrzymane w ramach realizacji projektu rozprawy pozwoliły na weryfikację hipotezy „rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji”. Moim zdaniem jest to pierwsza metodycznie prawidłowo przeprowadzona weryfikacja tej hipotezy

dla zwierząt planktonowych z wykorzystaniem porównania ze sobą wyników rozmieszczenia otrzymanych w symulacjach wygenerowanych na podstawie założeń ilościowego modelu optymalizacyjnego z wynikami rozmieszczenia osobników w eksperymencie rzeczywistym. Taka ilościowa weryfikacja hipotezy jest jedną z nielicznych znanych mi prób przeprowadzonych w nakładających się na siebie gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy u zwierząt.

Badania przeprowadzone w ramach realizacji tego projektu pozwoliły również na zweryfikowanie kilku innych hipotez, np. że kształt odpowiedzi funkcjonalnej ryby planktonożernej żerującej na zooplanktonie, w przeciwieństwie do wyników otrzymanych we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych w zminiaturyzowanych układach eksperymentalnych, jest zgodny z III, a nie z II typem. Spodziewam się, że skonstruowanie w ramach realizacji projektu rozprawy pionowego układu eksperymentalnego dla badania rozmieszczenia zooplanktonu w stabilnych, niezależnych od siebie i wyskalowanych względem warunków w jeziorze gradientach pokarmu, informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy, promieniowania UV i temperatury, pozwoli w niedalekiej przyszłości na zweryfikowanie kilku nowych hipotez.

## Abstract

The vertical distribution of planktonic animals in the water column of a lake or ocean is generally uneven. This unevenness is most often explained as the result of individual decisions, where each animal attempts to optimize its vertical location to achieve the best chances of survival and net energy gain. In the literature on planktonic animals, many examples are described of experiments that provide only qualitative (descriptive) evidence of the validity of this explanation. Quantitative evidence, however, is less numerous and so far consists only of generating virtual positions obtained from the results of mathematical calculations based on the assumptions of an optimizing mathematical model with no experimental verification of the predictions.

The aim of this dissertation study was to verify the hypothesis that "the distribution of zooplankton results from individual optimization," which postulates that the vertical distribution of individuals in the population of a model planktonic animal, such from the *Daphnia* genus, in various combinations of the environment's gradient characteristics, is the result of individual behaviors aimed at optimizing the depth chosen by an individual to find the best chances of survival and the highest rate of growth. This location depends on individual body size, density of the population and knowledge about the spatial differentiation for potential growth, as well as for the potential mortality risk. This hypothesis was verified in each of four combinations of two gradients, i.e. in the presence or absence of a food gradient with a maximum concentration in the water's subsurface layers and the gradient of information about predation threat – planktivorous fish use vision to locate their prey, so the gradient consisted of the intensity and spectrum of light. Verification of the hypothesis was based on comparing the real distribution of *Daphnia* (juveniles and adults) in different densities of their population obtained during experiments and the theoretical distribution obtained from simulations. The simulations were generated from four versions of the assumptions of the optimization model (written in the NetLogo programming language), based on the assumptions of the concept of interference ideal free distribution with costs (IIFDC), under conditions reflecting those of the experiment. Versions of the model differed in every possible combination of the two assumptions: first, that the shape of the functional response of fish (the relationship of the rate of consumption of juvenile or adult *Daphnia* and the density of their population) is consistent with the course of type II or III, and second, that each individual *Daphnia* has complete or incomplete knowledge about the potential growth rate and the potential mortality risk at every depth. The hypothesis would be confirmed when

the actual distribution is similar to the distribution generated in the simulations based on the assumptions of at least one of the four versions of the model.

The hypothesis was verified for *D. longispina* (a typical cladoceran lake species coexisting with planktivorous fish) by: **(1)** establishing and standardizing the conditions in the simulations and experiments; **(2)** constructing a simulation model; **(3)** constructing three successively refined experimental systems required for the study of the distribution of planktonic animals (from the horizontal setup through the initial vertical setup to the final vertical setup); **(4)** performing laboratory experiments to determine the parameters for the model, based on estimating: **(a)** the relationship of individual growth rate and the concentration of algal food, the population density of *Daphnia*, the age of the individual, and the light intensity, **(b)** the slowdown of *Daphnia* growth rate (juvenile and adult) in the food gradient resulting from the imperfect knowledge about the resources available in each location, **(c)** the relationship of the reaction distance of planktivorous fish (with respect to each of the two age classes) and the intensity and spectral composition of the light, **(d)** the relationship of *per capita* mortality risk from planktivorous fish and *Daphnia* population density (juveniles or adults) in each of the four groups of experiments (a, b, c and d) using different experimental systems (respectively: Lampert flow-through chambers for “a”, the final version of the experimental system to study zooplankton distribution consisting of two 1-meter high vertical columns for “b”, an experimental system constructed to observe the feeding behavior of fish preying on a constant density of planktonic animals for “c”, and a large experimental system consisting of two sets of ten 200-liter tanks connected in a circle to allow the fish to freely move between them for “d”); **(5)** generating virtual *Daphnia* distributions by simulating each of the four versions of the model assumptions (taking into account the type II or III functional responses of *Daphnia* that are “flawless” or “mistaken”; **(6)** performing laboratory experiments (in the proper vertical system to test the distribution of *Daphnia*) under the same experimental conditions and for the same *Daphnia* age classes as in the virtual experiments; **(7)** confronting the distribution of *Daphnia* from the actual experiments and the virtual experiments generated on the basis of each of the four versions of the model assumptions.

The results obtained in the dissertation did not unequivocally confirm the hypothesis that "the distribution of zooplankton results from individual optimization". The average results and the depth positions of *Daphnia* in their final equilibrium state of distribution were the same in the experiments as in the results obtained from the simulations only in certain

situations (in both the overlapping gradients for both age classes and in the food gradient only for adults). The most similar distributions were confirmed for the simulation based on the scenario that the course of the mortality risk with density of prey population is consistent with the type III functional response and that *Daphnia* make mistakes in estimating their growth rate and the mortality risk from predation. Observations on the depth choice of individuals showed that *Daphnia*, particularly adults, are in constant motion, even when they have reached the final equilibrium state of distribution, and that their mobility was lowest in the food gradient. The highest mobility occurred in both overlapping gradients, though this movement was relatively (in relationship to the remaining treatments) within a narrow range of depths.

It appears that the differences in average depths (and distributions) in the experiments and simulations in the food gradient of juveniles may result from an overestimation of the significance of errors made by the juveniles in estimating food concentrations used in the experiments to determine the parameters of the model. In contrast, the most likely explanation for the fact that individuals of both age classes remained closer to the water surface in the experiments (than in the simulations) in the treatment with the absence of a food gradient (in the presence and absence of the gradient of information on predation threat), which was not considered in the model assumptions, is the existence of “evolutionary memory”, i.e. additional (not considered in the model assumptions) motivation of the *Daphnia* to swim in the direction of the water’s subsurface layers (which are generally most abundant in food), especially when there is a low concentration of food at the depth where the individual is located.

The results obtained in the dissertation allowed me to verify the hypothesis that "the distribution of zooplankton results from individual optimization." In my opinion, this is the first methodologically proper verification of this hypothesis for planktonic animals, using a comparison of results for the distribution of *Daphnia* obtained in simulations based on the assumptions of a quantitative optimization model and actual experiments. The research carried out in this project also made it possible to verify several other hypotheses, e.g. that the shape of the functional response of planktivorous fish feeding on zooplankton is compatible with type III rather than type II, in contrast to the results obtained in earlier studies carried out in miniaturized experimental systems. I expect that the construction of a vertical experimental system for the dissertation to study the distribution of zooplankton in stable, independent and scaled, with respect to conditions in a lake, gradients of food, information on predation threat,

UV radiation and temperature, will enable several new hypotheses to be verified in the near future.



# Spis treści

<b>Streszczenie .....</b>	<b>5</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>9</b>
<b>I. Wstęp .....</b>	<b>16</b>
<b>II. Materiał i metody .....</b>	<b>35</b>
<b>II.1. Ogólny plan badań .....</b>	<b>35</b>
<b>II.2. Szczegółowy plan badań .....</b>	<b>38</b>
<b>II.2.1. Ustalenie warunków eksperymentalnych .....</b>	<b>38</b>
<b>II.2.2. Model symulacyjny .....</b>	<b>44</b>
<b>II.2.3. Układy eksperymentalne dla zbadania rozmieszczenia zwierząt planktonowych w gradiencie pokarmu i w gradiencie niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy .....</b>	<b>59</b>
<b>II.2.3.1. Wprowadzenie .....</b>	<b>59</b>
<b>II.2.3.2. Pierwsza wersja układu eksperymentalnego .....</b>	<b>60</b>
<b>II.2.3.3. Druga wersja układu eksperymentalnego .....</b>	<b>61</b>
<b>II.2.3.4. Trzecia (właściwa) wersja układu eksperymentalnego .....</b>	<b>63</b>
<b>II.2.4. Eksperymenty dla parametryzacji modelu .....</b>	<b>70</b>
<b>II.2.4.1. Zależność indywidualnego tempa wzrostu od stężenia pokarmu, zagęszczenia populacji <i>Daphnia</i>, wieku osobnika oraz od natężenia światła .....</b>	<b>70</b>
<b>II.2.4.2. Spowolnienie tempa wzrostu <i>Daphnia</i> w gradiencie pokarmu w wyniku braku perfekcyjnej wiedzy o zasobności każdego miejsca ...</b>	<b>72</b>
<b>II.2.4.3. Zależność odległości reakcji ryby planktonożernej od natężenia i składu spektralnego światła w zakresie widzialnym .....</b>	<b>74</b>
<b>II.2.4.4. Zależność ryzyka śmierci <i>per capita</i> ze strony ryby planktonożernej od zagęszczenia populacji zooplanktonu .....</b>	<b>80</b>
<b>II.2.5. Eksperymenty rzeczywiste dla weryfikacji prognoz modelowych .....</b>	<b>87</b>
<b>II.2.5.1. Informacje ogólne .....</b>	<b>87</b>
<b>II.2.5.2. Eksperymenty dla zbadania wpływu kierunkowego przepływu mediów na rozmieszczenie <i>Daphnia</i> .....</b>	<b>89</b>
<b>II.2.5.3. Eksperymenty dla wyznaczenia pionowego rozmieszczenia <i>Daphnia</i> w różnym zagęszczeniu ich populacji .....</b>	<b>90</b>
<b>II.2.5.4. Eksperymenty dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki .....</b>	<b>94</b>
<b>II.2.6. Symulacje z wykorzystaniem NetLogo .....</b>	<b>99</b>
<b>II.2.7. Analiza statystyczna danych .....</b>	<b>100</b>
<b>III. Wyniki .....</b>	<b>107</b>
<b>III.1. Parametryzacja modelu .....</b>	<b>107</b>
<b>III.1.1. Zależność tempa wzrostu od stężenia pokarmu, zagęszczenia populacji <i>Daphnia</i>, wieku osobnika oraz od natężenia światła .....</b>	<b>107</b>
<b>III.1.2. Spowolnienie tempa wzrostu <i>Daphnia</i> w gradiencie pokarmu w wyniku braku perfekcyjnej wiedzy o zasobności każdego miejsca .....</b>	<b>112</b>
<b>III.1.3. Zależność odległości reakcji ryby planktonożernej od natężenia</b>	

i składu spektralnego światła .....	113
<b>III.1.4.</b> Zależność ryzyka śmierci <i>per capita</i> ze strony ryby planktonożernej od zagęszczenia populacji zooplanktonu .....	115
<b>III.2.</b> Eksperymenty rzeczywiste dla weryfikacji prognoz modelowych oraz wyniki symulacji .....	117
<b>III.2.1.</b> Eksperymenty rzeczywiste .....	117
<b>III.2.2.</b> Porównanie prognoz modelowych z wynikami z eksperymentów rzeczywistych .....	125
<b>III.2.3.</b> Wybór głębokości przez pojedyncze <i>Daphnia</i> .....	142
<b>IV. Dyskusja</b> .....	146
<b>IV.1.</b> Wprowadzenie .....	146
<b>IV.2.</b> Eksperymenty dla parametryzacji modelu oraz symulacje .....	147
<b>IV.3.</b> Porównanie wyników symulacji z wynikami z eksperymentów rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych .....	150
<b>IV.3.1.</b> Porównanie prognoz modelowych i wyników z eksperymentów rzeczywistych w nieobecności któregośkolwiek gradientu .....	150
<b>IV.3.2.</b> Porównanie prognoz modelowych i wyników z eksperymentów rzeczywistych w gradiencie pokarmu .....	151
<b>IV.3.3.</b> Porównanie prognoz modelowych i wyników z eksperymentów rzeczywistych w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy .....	155
<b>IV.3.4.</b> Porównanie prognoz modelowych i wyników z eksperymentów rzeczywistych w obydwu nakładających się na siebie gradientach .....	155
<b>IV.4.</b> Wniosek ogólny .....	157
<b>IV.5.</b> Plany na przyszłość .....	158
<b>V. Piśmiennictwo</b> .....	159
<b>VI. Załączniki</b> .....	168

Prace w przygotowaniu (2) lub opublikowane (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), które powstały w ramach realizacji projektu rozprawy doktorskiej

- VI.1.** Maszczyk P. 2008 – Koncepcja rozmieszczenia idealnie swobodnego: czy tylko zasoby? –Wiadomości Ekologiczne 54: 113–141.
- VI.2.** Maszczyk i in. W przygotowaniu – Interference Ideal Free Distribution with costs of *Daphnia* in the gradient of resources and the gradient of risk to predation by planktivorous fish.
- VI.3.** Maszczyk P. 2016 – Miniature plankton columns to study the depth distribution of zooplankton at gradients of food, predation risk, temperature, and UV radiation – Limnology and Oceanography Methods 14: 210–223.
- VI.4.** Gliwicz Z.M., Maszczyk P., Uszko W. 2012 – Enhanced growth at low population density in *Daphnia*: the absence of crowding effects or relief from visual predation? – Freshwater Biology 57: 1166–1179.
- VI.5.** Maszczyk P., Bartosiewicz M. 2012 – Threat of treat: the role of fish exudate in the growth and life history of *Daphnia* – Ecosphere. 3 (10): 1–19.
- VI.6.** Bartosiewicz M., Jabłoński J., Kozłowski J., Maszczyk P. 2015 – Brood space limitation of reproduction may explain growth after maturity in

- differently sized *Daphnia* species – Journal of Plankton Research. 37: 417–428.
- VI.7.** Gliwicz Z. M., Maszczyk P., Jabłoński J., Wrzosek D. 2013 – Patch exploitation by planktivorous fish and the concept of aggregation as an antipredation defense in zooplankton – Limnology and Oceanography 58: 1621–1639.
- VI.8.** Maszczyk P., Gliwicz Z.M. 2014 – Selectivity by planktivorous fish at different prey densities, heterogeneities and spatial scales – Limnology and Oceanography 59: 68–78.
- VI.9.** Maszczyk P., Bartosiewicz M., Jurkowski J.E., Wyszomirski T. 2014 – Interference competition in a planktivorous fish (*Rutilus rutilus*) at different prey densities and temperatures – Limnology 15: 155–162.

## I. Wstęp

Jednym z najważniejszych celów ekologii jest niewątpliwie poznanie mechanizmów decydujących o rozmieszczeniu organizmów w przestrzeni (np. Charnov 1976, Fretwell i Lucas 1970, Lima i Dill 1990, Heithaus i Dill 2002, Krebs i Davies 2001). Rozmieszczenie to bywa z reguły nierównomierne. Obserwujemy to również w populacjach zwierząt planktonowych. Choć ta nierównomierność wyjaśniana jest czasem przez kierunkowe oddziaływanie abiotycznych czynników środowiska takich, jak prądy wodne wywołane przez wiatr (Pinel-Alloul 1995, Folt i Burns 1999, Blukacz i in. 2010), to jednak częściej wyjaśniana jest indywidualnymi decyzjami optymalizacyjnymi osobników, z których każdy nieustannie staje przed koniecznością maksymalizowania swojego zysku energetycznego netto i potrzebą minimalizowania ryzyka śmierci (Gliwicz 2003, Lampert 2011). Konieczność poszukiwania tych kompromisów jest najlepiej widoczna w słupie wody jeziora czy oceanu, gdzie zwierzęta żyją w nakładających się na siebie pionowych gradientach abiotycznych i biotycznych czynników środowiska. Zgodnie z teorią doboru osobniczego, każdy osobnik w populacji powinien być tak przystosowany do środowiska, by umieć wybierać takie miejsce (taką głębokość), w którym kombinacja cech środowiska daje mu najwyższe dostosowanie (ang. *fitness*), czyli najwyższe możliwe prawdopodobieństwo przeżycia i wydania największej liczby płodnego potomstwa. Gdy jest to spełnione, profil pionowy rozmieszczenia osobników populacji, na przykład modelowej wioślarki z rodzaju *Daphnia*, w każdej kombinacji gradientów oraz w każdym z gradientów z osobna wynikałby z optymalizacyjnych decyzji każdego osobnika.

Zgodnie z obszerną literaturą przedmiotu dotyczącą dobowych migracji zooplanktonu i wyboru głębokości przez zwierzęta planktonowe (De Meester i in. 1999, Lampert i Sommer 2007, Beklioglu i in. 2008, Lampert 2011, Larsson i Lampert 2012) największy wpływ na wybór głębokości mają trzy gradienty: **1.** gradient obfitości pokarmu (różnicujący tempo wzrostu i liczbę produkowanego potomstwa u osobników przebywających na różnej głębokości, Orcutt i Porter 1984), **2.** gradient temperatury (również różnicujący tempo wzrostu, a także tempo rozrodu, Bottrell i in. 1976) oraz **3.** gradient światła (natężenia i składu widma) warunkujący stopień ryzyka śmierci, czyli niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy posługującego się wzrokiem przy lokalizacji ofiary, przede wszystkim ryby planktonożerne (Zaret i Suffern 1976). Z licznych obserwacji terenowych oraz eksperymentów terenowych i laboratoryjnych wiadomo na przykład, że zwierzęta planktonowe w dzień, w typowym dla większości jezior w stratyfikacji letniej gradiencie

pokarmu (zazwyczaj z maksimum w przypowierzchniowych warstwach wody), unikają prześwietlonych, obfitych w pokarm i ciepłych warstw przypowierzchniowych, w których ryzyko śmierci ze strony ryby planktonożerne jest największe, i że dzieje się tak szczególnie w przypadku osobników najedzonych (z większą ilością zgromadzonych zapasów i tym samym z mniejszą motywacją do przebywania w miejscach zasobnych, Huntley i Brooks 1982, Hays i in. 2001) oraz osobników bardziej widocznych (na przykład osobników z większą ilością zgromadzonych zapasów i matek noszących jaja w komorze lęgowej, Guisande i in. 1991). Powszechnie wiadomo również, że w nocy, gdy ryzyko śmierci jest małe nawet w warstwach przypowierzchniowych, zwierzęta planktonowe przebywają bliżej powierzchni, i że głównym czynnikiem decydującym o ich skupianiu się pod powierzchnią jest wysoka temperatura (Loose i Dawidowicz 1994), szczególnie w środowiskach bogatych w pokarm (Beklioglu i in. 2008). Co prawda, wszystkie wyżej opisane obserwacje (i wiele innych) dowodzą tego, że zwierzęta planktonowe uwzględniają w wyborze głębokości zarówno (zależną od temperatury i stężenia pokarmu) ilość uzyskiwanych zasobów, jak i ryzyko śmierci ze strony drapieżcy, ale dają tylko pośrednie (jakościowe – opisowe) dowody na to, że w stanie ostatecznie ukształtowanej równowagi rozmieszczenia, każdy osobnik wybiera taką głębokość, która gwarantuje mu największe możliwe dostosowanie wynikające z maksymalizacji tempa wzrostu i minimalizacji ryzyka śmierci w danych warunkach środowiska, i w której żaden z konkurujących ze sobą osobników nie może zwiększyć swojego dostosowania zmieniając głębokość przebywania (rozmieszczenie zgodne ze strategią ewolucyjnie stabilną, Smith i Price 1973).

W literaturze przedmiotu można odnaleźć również liczne prace teoretyczne, w których opisane zostały różne aspekty dobowych migracji pionowych (ang. *diel vertical migration*, *DVM*) oraz wyboru głębokości (ang. *depth selection*, *DS*) za pomocą wybranego optymalizacyjnego modelu matematycznego (np. McLaren 1974, Aksnes i Giske 1993, Fiksen 1997, Giske i in. 1997, Sekino i Yamamura 1999, Tarling i in. 2000, De Robertis 2002). O ile cechą wspólną każdego z tych modeli jest uwzględnienie w założeniach dotyczących rozmieszczenia zwierząt wpływu głównych cech środowiska takich, jak ryzyko śmierci ze strony drapieżcy, stężenie pokarmu i temperatura, o tyle cechą charakterystyczną każdego z nich jest uwzględnienie również jakiejś dodatkowej cechy środowiska lub cechy osobnika, od której również zależy wybór głębokości. Na przykład, zagęszczenie populacji jest uwzględniane w modelach rozmieszczenia idealnie swobodnego (*IFD*, np. Giske i in. 1997), wiek osobnika w modelach z zakresu *life history theory* (*LHT*, np. McLaren 1974), a kondycja osobnika w modelach *dynamic optimisation* (*SDP*, np. Sekino i Yamamura 1999).

Jednakże, każdy z tych modeli weryfikuje jedynie pośrednio hipotezę "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji", wg której rozmieszczenie osobników w populacji zwierzęcia planktonowego w wybranych gradientach cech środowiska jest grupowym efektem optymalizacyjnych decyzji osobników zmierzających do maksymalizacji zysku energetycznego i minimalizacji ryzyka śmierci, ponieważ każdy z nich jest modelem opisowym *a posteriori* (model „po fakcie”), w którym parametry i zależności zostały tak dobrane, aby za jego pomocą wyjaśnić wybór głębokości w jakimś wybranym scenariuszu (kombinacji cech środowiska). Co więcej, przewidywania żadnego z tych modeli ani nie zostały do dziś zweryfikowane eksperymentalnie, ani nawet nie zostały porównane z rozmieszczeniem obserwowanym w jeziorze. Nawet, jeśli w niektórych pracach teoretycznych z wykorzystaniem modelu optymalizacyjnego (np. Tarling i in. 2000) wyniki rozmieszczenia otrzymane w symulacjach zostały porównane (w tych samych warunkach środowiska) z rozmieszczeniem zooplanktonu w jeziorze, to taka weryfikacja hipotezy, jedynie za pomocą modelu matematycznego (bez eksperymentalnej weryfikacji jego przewidywań) może być obarczona błędem, ponieważ efekty wynikające z oddziaływania cech środowiska uwzględnione w modelu mogą być zacierane przez efekty innych cech środowiska naturalnego, które nie zostały uwzględnione w modelu.

Wydaje się, że najskuteczniejszym sposobem weryfikacji hipotezy "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji" jest ilościowe skonfrontowanie (w takich samych warunkach środowiska) rozmieszczenia osobników w eksperymentach rzeczywistych z teoretycznym rozmieszczeniem osobników wirtualnej populacji otrzymanym w wyniku symulacji na podstawie założeń optymalizacyjnego modelu symulacyjnego lub w wyniku wyliczeń matematycznych na podstawie założeń optymalizacyjnego modelu matematycznego, czego próbowali Lampert i in. (2003), Winder i in. (2004), Kessler i Lampert (2004a) oraz Lampert (2005). Hipoteza zostaje potwierdzona, gdy rozmieszczenie rzeczywiste jest podobne do rozmieszczenia wirtualnego. Przewagą weryfikacji hipotezy za pomocą modelu ilościowego (symulacyjnego lub matematycznego) nad „modelem opisowym” jest to, że pozwala na bardzo precyzyjne sformułowanie założeń i sprawdzenie, czy te założenia nie są wewnętrznie sprzeczne. Weryfikacja taka przebiega w pięciu etapach. **Po pierwsze**, zostaje wybrana miara dostosowania, którą, z jednej strony, relatywnie łatwo wyznaczyć w eksperymencie, a z drugiej strony, jest miarą wystarczająco satysfakcjonującą, aby uznać ją za dobry odpowiednik maksymalizacji szansy przeżycia i wydania płodnego potomstwa w określonych warunkach środowiskowych (na przykład: racja pokarmowa, Fretwell i Lucas 1970 lub indywidualne tempo wzrostu, Lampert i Trubetskova 1996 w

gradientie pokarmu; iloraz tempa wzrostu do ryzyka śmierci, Werner i Gilliam 1984, iloraz tempa konsumpcji do ryzyka śmierci, Gilliam i Fraser 1987 lub potencjał reprodukcyjny, Moody i in. 1996 w nakładających się na siebie gradientach pokarmu i ryzyka śmierci ze strony drapieżcy) i przyjęte zostaje założenie, że albo osobnik ma kompletną informację o atrakcyjności każdej głębokości i wybiera taką, która w danych warunkach gwarantuje mu największe dostosowanie, charakteryzowane wybraną miarą, albo, że osobnik nie ma kompletnej informacji o atrakcyjności środowiska. W drugim przypadku należy przyjąć dodatkowe założenie dotyczące zależności między obiektywną jakością każdego miejsca, a postrzeganiem tej jakości przez osobnika. **Po drugie**, miara dostosowania zostaje połączona sparametryzowanymi (na podstawie eksperymentów i obserwacji) zależnościami z każdą z cech środowiska (np. ze stężeniem pokarmu, temperaturą i niebezpieczeństwem ze strony drapieżcy lub/i z zagęszczeniem populacji zwierzęcia planktonowego) i osobnika (jego kondycją, rozmiarem lub/i wiekiem), stając się wspólną walutą, dzięki której możliwe jest wyznaczenie przewidywanego dostosowania netto osobnika, wynikającego z łącznego oddziaływania wszystkich zmieniających się z głębokością czynników. **Po trzecie**, na podstawie charakterystyki środowiska wirtualnego i zależności między cechami środowiska i miarą dostosowania zostaje wyznaczony przebieg dostosowania w różnych miejscach w środowisku. **Po czwarte**, zostaje przeprowadzony eksperyment wirtualny w wyniku, którego powstaje teoretyczne rozmieszczenie osobników w populacji. **Po piąte**, rozmieszczenie wirtualne zostaje skonfrontowane z rozmieszczeniem otrzymanym w eksperymencie rzeczywistym.

Eksperymentalna weryfikacja hipotezy "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji" za pomocą modelu ilościowego została przeprowadzona tylko dla dwóch nietypowych kombinacji warunków środowiska, a mianowicie w gradientie pokarmu z głębinnym maksimum jego obfitości, w gradientie temperatury, i w nieobecności (Lampert i in. 2003, Kessler i Lampert 2004a) lub w obecności (Winder i in. 2004) gradientu niebezpieczeństwa ze strony ryby planktonożerne. Jednak w pracach, w których podjęto próbę weryfikacji hipotezy w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (Lampert i in. 2003, Kessler i Lampert 2004a, Lampert 2005), przyjęto kontrowersyjne i nigdy niezeweryfikowane założenie, że zagęszczenie populacji zwierzęcia wpływa na zmianę przebiegu dostosowania w taki sposób, że o ile w gradientach pokarmu i temperatury wszystkie osobniki wybiorą tylko jedno miejsce, o tyle ze względu na obecność innych osobników (uwzględnienie zagęszczenia populacji) grupowy efekt indywidualnych decyzji wszystkich osobników powoduje, że rozmieszczenie zwierząt

staje się wprost-proporcjonalne do przebiegu dostosowania w gradiencie pokarmu i temperatury (drugi etap weryfikacji). Pomimo tego, że rzeczywiście rozmieszczenie zwierząt w tak przeprowadzonych eksperymentach było zgodne z tymi przewidywaniami, równie prawdopodobne wydaje się, że takie rozmieszczenie wynika z braku kompletnej wiedzy o atrakcyjności każdego miejsca - głębokości (Abrahams 1986). Potwierdzenie słuszności drugiego wyjaśnienia możliwe byłoby jedynie poprzez zaobserwowanie zachowań migracyjnych pojedynczych osobników, co nie było technicznie możliwe do wykonania w układzie eksperymentalnym (wielu planktonowych) wykorzystanym w powyższych badaniach (Lampert 2005). Z kolei weryfikacja opisana w pracy Winder i in. (2004) jest obarczona innym błędem, polegającym na przyjęciu nieprawidłowej miary dostosowania (pierwszy etap weryfikacji). Pomimo tego, że zarówno w eksperymencie laboratoryjnym, jak i w terenowym, zwierzęta planktonowe rozmieszczały się w obecności gradientu niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy posługującego się wzrokiem (gradientu natężenia i spektrum światła), to ich rozmieszczenie porównane było do przebiegu dostosowania wyznaczonego jedynie na podstawie oszacowanego na każdej głębokości indywidualnego tempa wzrostu, które nie uwzględnia tego, że niebezpieczeństwo ze strony drapieżcy wpływa na dostosowanie. Wobec przyjętych błędnych założeń w powyższych pracach stwierdzić mogę, że w literaturze nie ma dotychczas żadnej prawidłowej eksperymentalnej weryfikacji hipotezy "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji" u zwierząt planktonowych. Nie ma takiej weryfikacji nawet dla najbardziej klasycznego scenariusza, w którym zwierzęta przemieszczają się w typowym gradiencie pokarmu (z maksimum stężenia przy powierzchni) i w gradiencie niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy, gdy każdy osobnik w populacji powinien poszukiwać kompromisu między maksymalizacją tempa wzrostu determinowanego przez warunki pokarmowe i minimalizacją ryzyka śmierci determinowanego przez umiejętność unikania drapieżcy.

Indywidualne tempo wzrostu może być dobrą miarą dostosowania w samym gradiencie pokarmu, w samym gradiencie temperatury lub w tych dwóch nakładających się na siebie gradientach (Lampert i Trubetskova 1996). Wtedy, dostosowanie na każdej głębokości może być łatwo wyznaczone eksperymentalnie dla jednej konkretnej kombinacji cech środowiska (Kessler i Lampert 2004a) lub za pomocą, sparametryzowanego eksperymentalnie, relatywnie prostego modelu, który pozwala na bardziej uniwersalną weryfikację hipotezy dla każdej kombinacji stężenia pokarmu i temperatury (model dynamicznego bilansu energetycznego – ang. *dynamic energy budget model*, Lampert i in. 2003 lub równanie Monoda uwzględniające wpływ temperatury na tempo rozwoju jaj i czas reprodukcji, Winder i in. 2004). Jednak, gdy



w środowisku obecny jest również gradient ryzyka śmierci ze strony drapieżcy, miara dostosowania powinna uwzględnić również wpływ drapieżnika na to dostosowanie, choćby za pomocą ilorazu tempa wzrostu do ryzyka śmierci (Werner i Gilliam 1984). Co więcej, zastosowanie bardziej skomplikowanej miary dostosowania wymaga skonstruowania bardziej złożonego modelu, w którym uwzględniona byłaby zależność ryzyka śmierci od różnych cech środowiska (natężenia i spektrum światła, zagęszczenia populacji ofiary, zagęszczenia drapieżnika oraz od różnych cech ofiary (np. wielkości jej ciała). Dodatkową komplikacją jest konieczność uwzględnienia w modelu tego, jak obydwa komponenty informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy, czyli gradient światła (jego natężenie i spektrum) oraz chemiczna informacja o tym niebezpieczeństwie (kairomony rybie), modyfikują ryzyko śmierci poprzez wywoływanie reakcji obronnej zwierzęcia planktonowego ujawniające się w spowolnieniu tempa wzrostu oraz w zmniejszeniu ryzyka śmierci wywołanego przystępowaniem do reprodukcji przy mniejszych rozmiarach ciała. Dla sparametryzowania modelu potrzebna jest wobec tego dodatkowa informacja o zmianach historii życia wywołanych przez różne natężenia (i spektra) światła oraz różne stężenia kairomonów.

Prawdopodobną przyczyną, dla której hipoteza za pomocą modelu ilościowego nie została do tej pory zweryfikowana nawet w typowym gradiencie pokarmu i w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie wywołującego potencjalną reakcję u *Daphnia* (będącego odzwierciedleniem gradientu niebezpieczeństwa wywołanego przez drapieżcę posługującego się wzrokiem), jest problem koncepcyjny z odpowiednią konstrukcją układu eksperymentalnego, który spełniałby każdy z sześciu warunków. **Po pierwsze**, powinien on być on na tyle duży, by możliwe było zbadanie w nim rozmieszczenia zwierząt w niskim zagęszczeniu populacji, ale równocześnie na tyle mały, by możliwa była w nim obserwacja wyboru głębokości podejmowanego przez pojedynczego osobnika. **Po drugie**, powinien umożliwiać swobodne przemieszczanie się zwierząt eksperymentalnych i szybkie ustalenie się równowagi dynamicznej w ich rozmieszczeniu. **Po trzecie**, powinien zapewniać trwałość każdego z gradientów i możliwość ich powtarzania, a także powinien umożliwiać oszacowanie rozmieszczenia zwierząt oraz pobranie prób wody z różnych głębokości bez zaburzenia któregośkolwiek gradientu. **Po czwarte**, powinien umożliwiać stworzenie każdego z gradientów niezależnego od obecności innych gradientów. **Po piąte**, powinien pozwalać na stworzenie każdego z gradientów, który odzwierciedlałby typową sytuację w jeziorze (zakres wartości, w tym najwyższe wartości, każdego z gradientów powinny być zawarte w zakresie wartości w słupie wody w jeziorze), a jednocześnie odzwierciedlałby gradienty wirtualne tworzone w symulacjach modelowych. Wreszcie **po szóste**, powinien pozwalać na

wyeliminowanie tych cech, które wpływać mogą na wybór głębokości przez osobniki, a których wpływ nie został uwzględniony w układzie wirtualnym (na przykład gradient promieniowania UV lub gradient temperatury).

Pierwszy z dwóch najbardziej znanych układów eksperymentalnych dla badania pionowego rozmieszczenia zwierząt planktonowych, tzw. „organy planktonowe” (Dawidowicz 1993), spełnia tylko pięć spośród sześciu warunków (oprócz pierwszego) i spełnia je jedynie dla samego gradientu termicznego. Drugi układ (już nieistniejący), czyli 12-metrowe „wieże planktonowe” w Instytucie Limnologii Maxa Plancka w Plön (Lampert i Loose 1992; Lampert 2011) spełniał każdy z sześciu warunków, ale jedynie dla gradientu termicznego i gradientu informacji o niebezpieczeństwie, uniemożliwiał natomiast stworzenie samego gradientu pokarmu bez obecności gradientu gęstości wody wynikającego z gradientu temperatury (niespełniony warunek czwarty).

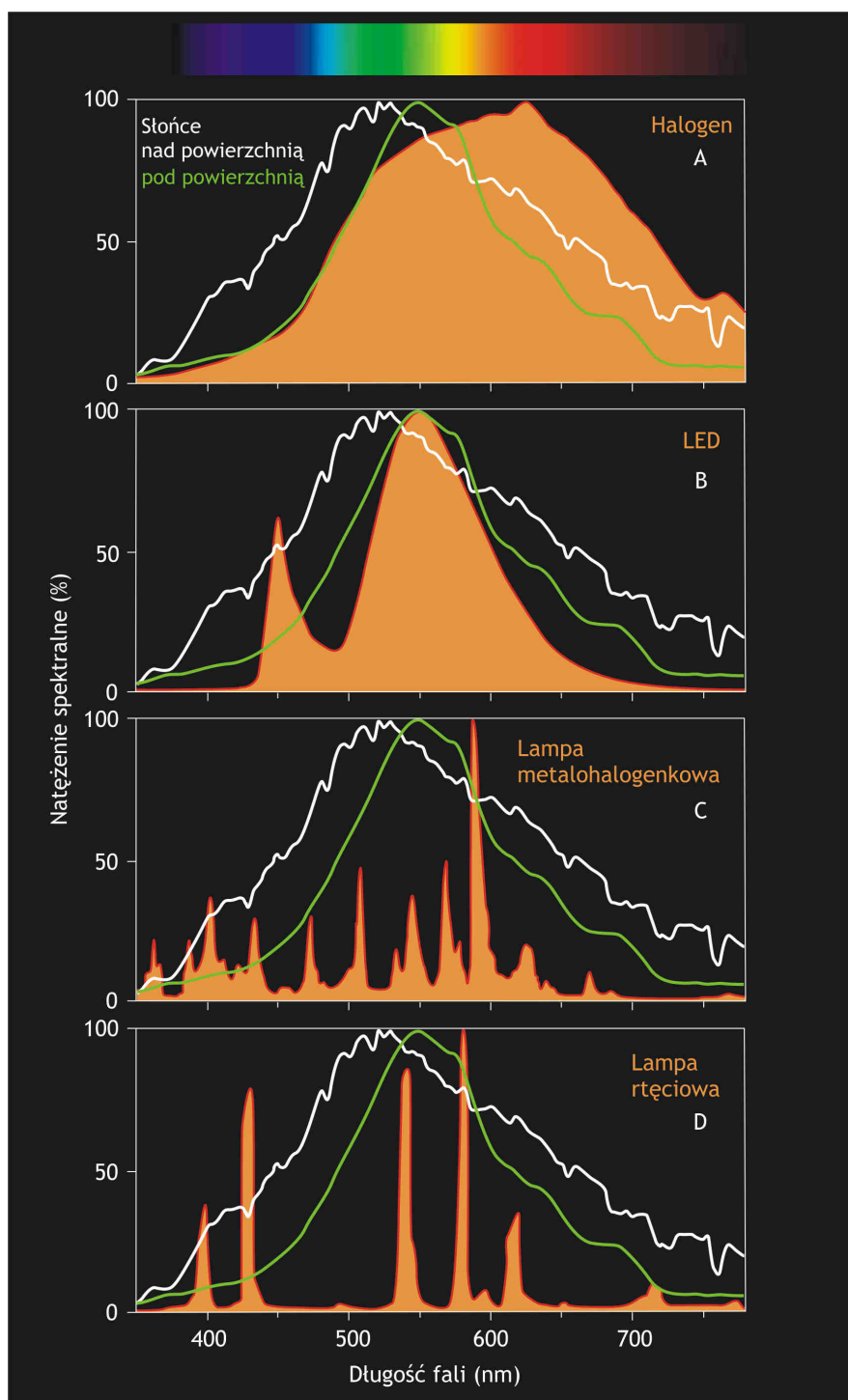
W przypadku gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy, trudność polega na konieczności względnie wiernego odwzorowania gradientu światła i gradientu kairomonów rybich zgodnie z warunkami panującymi na różnych głębokościach w jeziorze. Dodatkowym problemem jest również konieczność odwzorowania zmian natężenia i składu spektralnego światła w cyklu dobowym.

Odzwierciedlenie gradientu światła jest relatywnie łatwe jedynie w układzie eksperymentalnym w skali 1:1, w którym światło słoneczne przechodzące przez przezroczysty dach, wygaszane jest wraz z głębokością, a jego natężenie i spektrum zmienia się w naturalnym tempie w cyklu dobowym, jak miało to miejsce w wieżach planktonowych w Plön (Lampert i Loose 1992; Lampert 2011). Skonstruowanie takiego układu eksperymentalnego wymagało jednak dostosowania do niego czterech pięter nowo wybudowanego budynku. W układach zminiaturyzowanych odzwierciedlenie gradientów wymaga kompresji wszystkich ważnych cech światła, każdej z nich w tej samej skali. Natomiast zmiany w cyklu dobowym mogą być wytworzone albo za pomocą dostarczenia systemem światłowodów światła słonecznego, albo zasymulowane automatycznie za pomocą sterownika podłączonego do sztucznych źródeł światła. W literaturze przedmiotu nie ma opisu żadnego układu, który by spełniał takie warunki. Odnaleźć można jedynie nieliczne opisy takich układów, w których próbowano stworzyć gradient natężenia światła w skali poprzez wprowadzenie tuszu drukarskiego do medium (Harris i Wolfe 1955). Zmiany spektrum światła wraz z głębokością, wynikające z selektywnego absorbowania różnych długości fal przez wodę oraz cząstki w niej zawieszone i substancje w niej rozpuszczone (np. Tabela 5.3 w *Light in Inland Waters*), nie zostały natomiast uwzględnione w żadnym z

opisanych w literaturze układów, choć wiadomo, że reakcja zwierząt planktonowych na różne długości fal świetlnych jest różna. Wiadomo na przykład, że *Daphnia magna* charakteryzuje się nieliniową wrażliwością spektralną w bliskim ultrafiolecie i w zakresie widzialnym z największą czułością fotoreceptorów przy 370, 435, 570 oraz 685 nm (Smith i Macagno 1990), i że o ile promieniowanie UV oraz długości fal odpowiadające kolorowi niebiesko-zielonemu ( $\approx 435$ ) wywołuje u *Daphnia* fototaksję ujemną, o tyle długości fal odpowiadające kolorowi czerwonemu ( $\approx 685$ ) wywołują fototaksję dodatnią (Smith i Baylor 1953). Problem w odzwierciedleniu spektrum światła z wykorzystaniem sztucznego źródła światła nie leży jedynie w konieczności jego skompresowania, ale również w stworzeniu wejściowego widma źródła światła, które przypominałoby widmo światła słonecznego. Widma każdego ze źródeł światła powszechnie wykorzystywanych w badaniach zachowań zwierząt planktonowych dalece różnią się od spektrum światła słonecznego (Rys. 1). Halogenowe źródło światła wykorzystywane na przykład w „organach planktonowych” ma zbyt duży udział fal dłuższych odpowiadających kolorowi pomarańczowo-czerwonemu. Typowe źródła światła LEDowego (wykorzystywanego na przykład w popularnym systemie *BMX*) mają natomiast zbyt mały udział fal w tym zakresie oraz niedobór fal również w zakresie między 460-520 nm. Przebieg widma innych powszechnie stosowanych źródeł światła, na przykład lamp metalohalogenkowych (w wieżach planktonowych w Plön i w układzie eksperymentalnym opisanym w pracy Rhode i in. 2001) oraz kombinacji lamp metalohalogenkowych i rtęciowych (w wieży planktonowej na Uniwersytecie w Dalhousie, Price 1989, Rys. 1) jeszcze bardziej różni się od przebiegu widma słońca. Nawet jeśli wypadkowe spektrum z tych źródeł światła daje barwę zbliżoną do barwy słońca (np. dla niektórych lamp metalohalogenkowych wskaźnik *CRI*  $> 97$ ), to barwa ta kalibrowana jest względem ludzkiego oka, natomiast wrażliwość spektralna ludzkiego oka różni się od wrażliwości oka rybiego (i oka *Daphnia*, Marshall i Arikawa 2014). Wobec tego, źródło światła o wysokim wskaźniku *CRI* może dawać kolor światła, który dla ryby (i *Daphnia*) jest różny od koloru światła słonecznego. Dlatego odtworzenie w laboratoryjnym układzie eksperymentalnym spektrum światła słonecznego wymaga dostarczenia za pomocą światłowodów światła słonecznego lub zastosowania sztucznego źródła światła, które jest skompilowane z kilku różnych rodzajów źródeł światła (na przykład ledowego i halogenowego) z nałożonymi na nie kilkoma różnokolorowymi filtrami kształtującymi ostateczne spektrum.

Stworzenie realnego gradientu informacji o niebezpieczeństwie wymaga również odzwierciedlenia gradientu kairomonów. Problem z odzwierciedleniem gradientu kairomonów (jako dodatkowego obok gradientu światła komponentu realnego gradientu

informacji o niebezpieczeństwie ze strony ryby) wynika z nieznanego natury chemicznej tych związków, a więc i z niemożności zweryfikowania, czy gradient kairomonów w układzie eksperymentalnym pokrywa się z gradientem na różnych głębokościach w słupie wody jeziornej. Wobec tego ograniczenia, w badaniach nad wpływem kairomonów na historię życia, morfologię i zachowania zwierząt planktonowych stosuje się albo kairomony wydzielane przez rybę znajdującą się w dużym układzie eksperymentalnym w klatce (np. De Meester i in. 1995, Ślusarczyk i Pinel-Alloul 2010), albo kairomony wprowadzane do zminiaturyzowanego układu z przefiltrowaną wodą pochodzącą z akwarium z rybami (Macháček 1993, Gliwicz, Dawidowicz, Maszczyk 2006a). O ile w pierwszym rozwiązaniu chodzi o relatywnie wierne odzwierciedlenie gradientu pionowego stężenia kairomonów, o tyle w drugim rozwiązaniu zakłada się ich homogenne rozmieszczenie w słupie wody.



**Rys. 1.** Spektrum czterech źródeł światła najczęściej wykorzystywanych w badaniach rozmieszczenia zwierząt planktonowych (zaznaczonego jako pomarańczowe pola): światła halogenowego (A, używanego np. w organach planktonowych, Dawidowicz i Loose 1992), światła ledowego (B, użytego np. w eksperymentach opisanej w pracy Itoh i Hisama 2010), światła emitowanego przez lampę metalohalogenkową (C, użytą np. w układzie eksperymentalnym opisanym w pracy Rhode i in. 2001), i emitowanego przez lampę rtęciową (D, użytego np. w Aquatronie zlokalizowanym na Uniwersytecie w Dalhousie, Price 1989) na tle letniego widma światła słonecznego nad powierzchnią (biała linia) oraz 0,75 m pod powierzchnią (zielona linia) wyznaczonych za pomocą spektrofotometru światłowodowego *USB2000-UV-VIS* firmy *Ocean Optics*.

W przypadku gradientu pokarmu, trudności w jego stworzeniu w układzie laboratoryjnym polegają, **po pierwsze**, na zapewnieniu jego stabilności w układzie na tyle dużym, aby można było badać rozmieszczenie osobników na poziomie populacji, **po drugie**, na zapewnieniu jego identyczności w różnych wariantach (czyli gradientu niezależnego od obecności innych gradientów, ani od zagęszczenia populacji). Żaden ze znanych mi z literatury układów eksperymentalnych nie spełnia obydwu tych warunków. Nawet w wieżach planktonowych w Plön, istnienie stabilnego gradientu pokarmu uzależnione było od obecności gradientu termicznego. Prawdopodobnie ze względu na brak możliwości stworzenia w tym układzie typowego gradientu z maksimum stężenia pokarmu bez obecności gradientu gęstości wody wynikającego z gradientu temperatury i tym samym braku możliwości zbadania konieczności osiągania kompromisów przez zwierzęta planktonowe między maksymalizacją tempa konsumpcji i minimalizacją ryzyka śmierci ze strony drapieżcy, wszystkie eksperymenty przeprowadzone w tym układzie dla zweryfikowania hipotezy "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji" ograniczały się do testowania jedynie kompromisu między wysoką temperaturą (większą zdolnością do szybkiego wykorzystywania pokarmu w epilimnionie) i wysokim stężeniem pokarmu (braku limitacji pokarmowej w hypolimnionie; Lampert i Loose 1992, Kessler i Lampert 2004a, Lampert i in. 2003, Lampert 2005). Natomiast nieliczne inne układy eksperymentalne, w których stworzono gradient pokarmu niezależny od innych gradientów (Jakobsen i Johnsen 1987, Neary i in. 1994, Larsson 1997, Bukovinszky i in. 2013), są na tyle zminiaturyzowane i o nietypowych kształtach, że nie można w nich zbadać rozmieszczania się zwierząt w słupie wody na poziomie populacji. Na przykład, stworzenie gradientu pokarmu w układzie eksperymentalnym Larssona możliwe było poprzez zorientowanie go w poziomie i zastosowanie dopływów świeżego medium z różnym stężeniem pokarmu (od góry) i odpływu zużytego (od dołu). Słaba mobilność *Daphnia* oraz jej niechęć do poziomego przemieszczania się, wymusiła zastosowanie kilku zabiegów zwiększających szansę na to, by osobniki sprawniej odnajdywały miejsce najbardziej zasobne. Po pierwsze, układ eksperymentalny był okrężny (*Daphnia*, przemieszczając się, albo w prawo albo w lewo, szybciej natrafiały na miejsce najbardziej zasobne) i bardzo mały ( $V = 2L$ ). Po drugie, w eksperymentach wykorzystano jedynie najbardziej mobilne do przemieszczania się w orientacji poziomej matki z jajami największej wioślarki *D. magna*.

Kluczowe dla weryfikacji hipotezy, że rozmieszczenie zwierząt planktonowych w gradiencie pokarmu i w gradiencie niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy jest wynikiem

optymalizacyjnych decyzji każdego osobnika w populacji zmierzającego do minimalizacji ryzyka śmierci i maksymalizacji zysku energetycznego, jest zbadanie wpływu wielkości ciała (osobników należących do różnych klas wiekowych) oraz wpływu zagęszczenia populacji ofiary. Wydaje się to kluczowe, ponieważ zarówno ilość zdobywanych zasobów, jak i ryzyko śmierci ze strony drapieżcy (a więc i hipotetyczne optymalne dla każdego osobnika rozmieszczenie) zależą od wielkości ciała osobnika oraz od zagęszczenia populacji ofiary.

W literaturze przedmiotu opisano wiele obserwacji terenowych i eksperymentalnych dotyczących wyboru głębokości przez *Daphnia* (jak i przez inne zwierzęta planktonowe) różniących się wiekiem i wielkością ciała. Na przykład wykazano, że starsze osobniki, i tym samym bardziej narażone na drapieżnictwo ze względu na większe rozmiary ciała, przebywają w dzień w głębszych warstwach wody, zarówno w jeziorze (Stich i Lampert 1981), jak i w oceanie (Hays i in. 2001), natomiast w nocy, przy niewielkim ryzyku śmierci ze strony ryb, spędzają więcej czasu w warstwach przypowierzchniowych w wyższej temperaturze (np. Dawidowicz 1993). Wiadomo również, że w warunkach stężenia pokarmu z głębinowym jej maksimum, osobniki młodociane przebywają w ubogich w pokarm, ale ciepłych, warstwach powierzchniowych, co tłumaczone jest albo tym, że pokarm jest dla nich relatywnie mniej ważny, ze względu na zmagazynowane w ciele rezerwy tłuszczowe przekazane przez matkę (Kessler i Lampert 2004a), albo tym, że są one mniej narażone na drapieżnictwo (Kessler i Lampert 2004b). Choć badania te wskazują na to, że zwierzęta planktonowe w każdym wieku zachowują się tak, jakby maksymalizowały swoje dostosowanie, to dowody na to są raczej pośrednie (opisowe), ponieważ w żadnym z tych badań rozmieszczenie różnych klas wielkości/wiekowych nie zostało porównane z ich rozmieszczeniem otrzymanym w symulacjach, na podstawie optymalizacyjnego modelu ilościowego, przeprowadzonych w tych samych warunkach środowiska.

Dobrym punktem wyjścia (modelem zerowym) dla ilościowego zbadania rozmieszczenia zwierząt w populacji zależnego od jej zagęszczenia może być koncepcja znana w literaturze angielskiej jako *ideal free distribution* lub *IFD* (Fretwell i Lucas 1970, Fretwell 1972) i przypominana polskiemu czytelnikowi w pracy przeglądowej jako koncepcja rozmieszczenia idealnie swobodnego (Maszczyk 2008, Załącznik 1). Koncepcja ta wyrasta z teorii optymalnego żerowania (MacArthur i Pianka 1966, Emlen 1966) i pozwala na przewidywanie optymalnego dla każdego osobnika w populacji rozmieszczenia zwierząt dla dwóch podstawowych scenariuszy: po pierwsze, w gradiencie dostawy zasobów, gdy poszczególne porcje zasobów docierają w stałym tempie do każdego z miejsc i są konsumowane natychmiast przez konkurentów, i po drugie, w stabilnym gradiencie stężenia zasobów

(Tregenza 1995). O ile sytuacja z pierwszego scenariusza jest często odtwarzana w eksperymentach, choć rzadko spotykana w przyrodzie (na przykład cząstki pokarmu spływające z prądem strumienia), o tyle sytuacja zgodna z drugim scenariuszem (opisywanym przez modele interferencyjne, ang. *interference ideal free distribution, IIFD*), choć rzadziej badana w eksperymentach, może zdarzać się częściej w warunkach naturalnych wtedy, gdy zasoby są ukryte lub duża śmiertelność w wyniku pasożytnictwa lub drapieżnictwa powoduje, że zagęszczenie populacji konkurentów jest dalekie od poziomu pojemności środowiska. W takiej sytuacji tempo konsumpcji jest spowalniane w wyniku straty czasu poświęcanego na interakcje między osobnikami, a nie w wyniku zmniejszającej się obfitości zasobów.

Każdy z dwóch podstawowych scenariuszy tej koncepcji oparty jest na kilku kontrowersyjnych założeniach. Po pierwsze, każdy osobnik w populacji precyzyjnie szacuje zasobność środowiska, wybierając takie miejsce, w którym może skosztować najwięcej zasobów i tym samym najszybciej rosnąć, produkując największą liczbę płodnego potomstwa. Po drugie, może swobodnie przemieszczać się z jednego miejsca do drugiego bez ponoszenia żadnych wydatków energetycznych na to przemieszczanie. Po trzecie, ma takie same zdolności konkurencyjne jak inne osobniki. Po czwarte, zysk energetyczny zależy od zagęszczenia populacji. Po piąte, w żadnym miejscu nie zmienia się tempo dostawy (**w pierwszym scenariuszu** ang. *continuous input*) lub stężenia zasobów (**w drugim scenariuszu** modeli interferencyjnych). Przy spełnieniu powyższych założeń, zgodnie z pierwszym scenariuszem, koncepcja przewiduje, że każdy osobnik będzie poszukiwał dla siebie optymalnego miejsca dopóki nie ustali się równowaga w rozmieszczeniu zwierząt w populacji, w której lokalne ich zagęszczenie odzwierciedlać będzie gradient dostawy zasobów (w każdym miejscu zagęszczenie powinno być wprost proporcjonalne do tempa dostawy lub/i produkcji zasobów) zarówno wtedy, gdy zagęszczenie populacji będzie dalekie, jak też, gdy będzie bliskie poziomowi pojemności środowiska. Natomiast zgodnie z drugim scenariuszem, rozmieszczenie zwierząt w stosunku do gradientu pokarmu będzie zależeć od siły pasywnej (w wyniku samej swojej obecności) lub aktywnej (agresji w stosunku do innych osobników) interferencji pomiędzy osobnikami (tak zwanego parametru  $m$ , Sutherland 1983, Tregenza i in. 1996). Gdy wartość tego parametru jest znikoma, wszystkie osobniki powinny wybrać miejsce z najwyższym stężeniem zasobów, gdy jest ona równa 1, wtedy rozmieszczenie powinno być wprost proporcjonalne do rozmieszczenia zasobów, i w końcu, gdy wartość tego parametru jest większa od 1, rozmieszczenie powinno być bardziej równomierne, niż rozmieszczenie zasobów. W stanie równowagi charakterystycznym dla obydwu scenariuszy, dostosowanie każdego osobnika, mierzone ilością konsumowanych zasobów w jednostce



czasu, będzie największe możliwe w danej podaży zasobów i zagęszczeniu populacji oraz takie samo w miejscu o niskiej i wysokiej podaży tych zasobów. Tempo konsumpcji zasobów będzie takie samo w miejscach o różnej zasobności zarówno wtedy, gdy zagęszczenie populacji będzie dalekie od poziomu pojemności środowiska, jak również wtedy, gdy będzie bliskie. Równowaga w rozmieszczeniu idealnie swobodnym jest ewolucyjnie stabilna (Smith i Price 1973), czyli w stanie tej równowagi żaden osobnik nie może zwiększyć swojego dostosowania przemieszczając się do innego miejsca w środowisku.

Drugi scenariusz koncepcji (reprezentowany przez modele interferencyjne) jest łatwiejszy do stworzenia w układzie eksperymentalnym i wydaje się lepszy dla badania rozmieszczenia *Daphnia*, ponieważ zysk energetyczny netto w samym gradiencie pokarmu zależy raczej od siły oddziaływań między osobnikami oraz od podaży zasobów, a nie od tempa dopływu pokarmu, tym bardziej, gdy badane jest ich rozmieszczenie w obecności gradientu niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy, gdy zagęszczenia populacji zwierząt planktonowych rzadko osiągają poziom pojemności środowiska w wyniku drapieżnictwa. Choć istnieją badania, w których próbowano przetestować za pomocą koncepcji *IFD* hipotezę „rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji” w różnych zagęszczeniach populacji *Daphnia* zarówno w samym gradiencie pokarmu (Larsson 1997), jak również w nakładających się na siebie gradientach pokarmu i temperatury (za pomocą zmodyfikowanej koncepcji *IFD* poprzez dodanie do niej kosztów energetycznych, Lampert i in. 2003, Kessler i Lampert 2004a, Lampert 2005, ang. *ideal free distribution with costs*, *IFDC*), to ze względu na błędne pomieszczenie warunków pokarmowych, charakterystycznych dla drugiego scenariusza (gradient stężenia pokarmu w układzie eksperymentalnym), z wnioskowaniem na temat spodziewanego rozmieszczenia *Daphnia*, charakterystycznego dla pierwszego scenariusza (spodziewane wprost-proporcjonalne rozmieszczenie zwierząt), prawidłowe przetestowanie hipotezy nie było możliwe. Nawet, gdy rozmieszczenie *Daphnia* przypominało rozmieszczenie zasobów, mogło być to wynikiem nie tylko oddziaływań między osobnikami, ale również innych mechanizmów, na przykład potrzeby ciągłego skanowania środowiska, ze względu na niekompletną wiedzę o jego zasobności (Abrahams 1986). To drugie wyjaśnienie może być nawet bardziej prawdopodobne, ponieważ zwierzęta pomimo swojej krótkotrwałej (Milinski i Regelmann 1985) i długotrwałej (Milinski 1994a, Tregenza i in. 1996) pamięci nie potrafią precyzyjnie oszacować różnic w zasobności środowiska. Jest tak, ponieważ zmysły zwierząt nie są wystarczająco czułe i nie wszystkie miejsca w środowisku są poznane w równym stopniu (Ranta i in. 1999). Tym bardziej nie zostało sprawdzone, jak rozmieszczenie idealnie swobodne w samym gradiencie pokarmu jest

modyfikowane przez gradient informacji o niebezpieczeństwie ze strony ryby planktonożernej, powodujący spowolnienie tempa wzrostu w wyniku konieczności minimalizacji ryzyka śmierci. Nie zostało również sprawdzone, czy ta modyfikacja zależy od wielkości ciała i zagęszczenia populacji potencjalnej ofiary, i czy jej rozmieszczenie w nakładających się dwóch gradientach jest zgodne ze strategią ewolucyjnie stabilną.

Należy się spodziewać, że zależna od zagęszczenia populacji *Daphnia* modyfikacja rozmieszczenia idealnie swobodnego w samym gradiencie pokarmu przez gradient informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy zależeć będzie od przebiegu odpowiedzi funkcjonalnej drapieżnika, czyli zależności tempa konsumpcji drapieżcy od zagęszczenia populacji ofiary. Ryzyko śmierci *per capita* otrzymać można poprzez podzielenie tempa konsumpcji przez wartości zagęszczeń populacji ofiary. Punktem wyjścia dla badań nad odpowiedzią funkcjonalną jest jedna z trzech krzywych zaproponowanych przez Hollinga (1959) dla opisu zmian racji pokarmowej osobnika wraz ze wzrostem zagęszczenia pokarmu, który może przebiegać prostoliniowo (typ I, charakterystyczny m.in. dla filtratorów planktonowych o znikomym czasie poświęcanym na zjedzenie ofiary, ang. *handling time*), hiperbolicznie (typ II, obserwowany u większości zwierząt, z rosnącą szansą spotkania ofiary wraz ze wzrostem jej zagęszczenia, ale rosnącą coraz wolniej, asymptotycznie do maksymalnej wielkości racji pokarmowej) i esowato (typ III). W wysokich zagęszczeniach przebieg odpowiedzi funkcjonalnej typu III jest podobny do przebiegu zgodnego z typem II (spowalniającym), ale w niskich zagęszczeniach staje się wykładniczym (przyspieszającym) i wynika ze spadku efektywności w odnajdywaniu lub/i w chwytaniu ofiar wraz ze spadkiem zagęszczenia. Spadek ten może wynikać z obecności skończonej liczby kryjówek dla potencjalnych ofiar, z relatywnie małego doświadczenia w chwytaniu i poszukiwaniu ofiar, lub z optymalizacji żerowania drapieżnika, polegającej na zmniejszającej się motywacji do żerowania (na konkretnym typie ofiary) wraz ze spadkiem jej zagęszczenia. Znaczenie kształtu odpowiedzi funkcjonalnej dla ofiary wyrazić można poprzez zależność ryzyka śmierci *per capita* od zagęszczenia populacji ofiary, którą otrzymuje się poprzez podzielenie wartości tempa konsumpcji przez zagęszczenie populacji ofiary. Przy przebiegu ryzyka odpowiadającym II typowi, jest ono największe przy najniższych zagęszczeniach ofiary i maleje wraz z zagęszczeniem w wyniku działania efektów grupy (efektu rozcieńczenia, konfuzji, „wielu par oczu”), tworząc refugium wysokiego zagęszczenia. Natomiast przy przebiegu ryzyka odpowiadającym III typowi, ryzyko śmierci jest największe przy zagęszczeniach pośrednich tworząc zarówno refugium wysokiego, jak i refugium niskiego zagęszczenia. Więc zgodnie z przebiegiem ryzyka, odpowiadającym II typowi odpowiedzi,

należy się spodziewać najsilniejszej modyfikacji rozmieszczenia idealnie swobodnego w samym gradiencie zasobów przez gradient niebezpieczeństwa w najniższych zagęszczeniach populacji. Natomiast, gdy przebieg tego ryzyka jest zgodny z III typem odpowiedzi, najsilniejszej modyfikacji należy się spodziewać w zagęszczeniach pośrednich.

O ile w literaturze przedmiotu brakuje jakiegokolwiek próby wyznaczenia samej odpowiedzi funkcjonalnej (bez zbadania odpowiedzi agregacyjnej) dla ryby planktonożernej w eksperymencie terenowym, o tyle można odnaleźć liczne prace, w których opisano taką próbę przeprowadzoną w eksperymencie laboratoryjnym dla różnych gatunków ryb żerujących na wybranym typie planktonowej ofiary (na przykład młodocianego leszcza na *Daphnia magna* (Townsend i Risebrow 1982) lub ciernika na *Artemia* (Vollset i Bailey 2011)). W olbrzymiej większości tych prac (13 spośród 16, Tabela 1) wykazano II typ odpowiedzi funkcjonalnej (w pozostałych 3 pracach kształt odpowiedzi był niejasny). Wynik ten stoi w sprzeczności do przewidywań z prac teoretycznych zgodnie z którymi, dla ryb i dla innych zwierząt kręgowych, spodziewać się należy raczej III typu odpowiedzi. Należy się tego spodziewać nie tylko w sytuacji, gdy drapieżnik żeruje na kilku alternatywnych typach ofiary różniących się atrakcyjnością i zagęszczeniem, ale nawet wtedy, gdy drapieżnik żeruje tylko na jednym typie ofiary. Jest tak prawdopodobnie, dlatego że ryby mają zdolność do uczenia się, a więc również potencjalną możliwość regulowania swoich zachowań, dostosowując je do aktualnych (i lokalnych) warunków pokarmowych, na przykład większej prędkości płynięcia w miejscu z niskim zagęszczeniem ofiary (Hunter i Thomas 1974, Munk i Kiørboe 1985, Ruzicka i Gallagher 2006). Większa prędkość płynięcia wynikać może z tego, że ryba widząc sporadycznie ofiary motywuje się do intensywniejszego poszukiwania miejsca, w którym ich zagęszczenie może być większe. Im natomiast płynie szybciej, tym częściej, relatywnie do zagęszczenia, pomija ofiary, ponieważ dla szybko płynącej ryby, po pierwsze, ofiary stają się mniej widoczne (Gendron i Staddon 1983), i po drugie rosną koszty energetyczne poświęcane na zatrzymywanie się, aby pochwycić ofiarę i na ponowne przyspieszenie (Ware 1978, Domenici i Blake 1997, Maszczyk i Gliwicz 2014). W kontekście tych obserwacji należy zauważyć, że wszystkie dotychczasowe eksperymentalne próby określenia typu odpowiedzi funkcjonalnej ryby planktonożernej przeprowadzone były w przestrzeni ograniczonej poprzez wielkość układów eksperymentalnych (w akwariach 2- do 50-litrowych), w których ryba czuła się uwięziona, nie mogąc regulować swojej prędkości płynięcia w zależności od zagęszczenia pokarmu. Możliwe, że po wyeliminowaniu tego „efektu skali” (Englund i Cooper 2003), gdy ryba miałaby możliwość swobodnego regulowania prędkości, kształt jej odpowiedzi funkcjonalnej stałby się zgodny z III typem. Z

jednej strony, ze względu na niepewność, który typ odpowiedzi funkcjonalnej lepiej opisuje tempo żerowania ryby w zależności od zagęszczenia planktonowej ofiary, z drugiej strony, ze względu na to, że kształt odpowiedzi funkcjonalnej może odgrywać istotną rolę w prognozowaniu optymalizacyjnych decyzji *Daphnia*, dla weryfikacji hipotezy rozprawy, niezbędne było skonstruowanie dwóch wersji modelu, jednej, zakładającej II typ i drugiej, zakładającej typ III.

**Celem badań** w ramach rozprawy było zweryfikowanie hipotezy "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji" postulującej, że rozmieszczenie pionowe osobników w populacji modelowego zwierzęcia planktonowego (wioślarki z rodzaju *Daphnia*) w różnych kombinacjach gradientów cech środowiska wynika z indywidualnych zachowań zmierzających do optymalizacji położenia pionowego osobników ze względu na szanse przeżycia i tempo wzrostu. Zachowania te zależą od wielkości ciała osobnika, zagęszczenia jego populacji i od wiedzy o przestrzennym zróżnicowaniu potencjalnego tempa wzrostu i przestrzennym zróżnicowaniu potencjalnego ryzyka śmierci. Hipoteza została zweryfikowana w każdej z czterech kombinacji dwóch gradientów, tj. w obecności lub w nieobecności gradientu pokarmu z maksimum jego stężenia w warstwach przypowierzchniowych i gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy - ryby planktonożernej posługującej się wzrokiem przy lokalizacji ofiary, w gradiencie natężenia i spektrum światła. Weryfikacja hipotezy polegała na porównaniu rzeczywistego rozmieszczenia *Daphnia* otrzymanego w eksperymencie rzeczywistym z rozmieszczeniem teoretycznym otrzymanym w symulacjach ilościowego modelu optymalizacyjnego opartego na założeniach koncepcji interferencyjnego rozmieszczenia idealnie swobodnego (*IIFD*), w warunkach odzwierciedlających warunki w eksperymencie rzeczywistym. Hipoteza zostałaby potwierdzona, kiedy rozmieszczenia te okazałyby się podobne.

W skład głównej hipotezy wchodziły **cztery hipotezy szczegółowe**, każda dla prognozowanego scenariusza w jednej z czterech kombinacji gradientów: tj. w obecności lub w nieobecności gradientu pokarmu i w obecności lub w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy. **Pierwsza** z nich postulowała, że w nieobecności któregośkolwiek gradientu rozmieszczenie młodych i dojrzałych *Daphnia* zarówno w symulacjach, jak również w eksperymentach rzeczywistych, w stanie ostatecznie ukształtowanej równowagi (w którym ich rozmieszczenie nie zmienia się już istotnie w następnych przedziałach czasowych) jest równomierne ze względu na to, że każdy osobnik wybiera taką głębokość, która umożliwia mu zminimalizowanie negatywnych interakcji z innymi osobnikami (np. w wyniku konkurencji o miejsce). **Druga** hipoteza przewidywała, że

w samym gradiencie pokarmu rozmieszczenie osobników (młodych i dojrzałych) w eksperymencie rzeczywistym jest zgodne z rozmieszczeniem wirtualnych osobników, powstałym w wyniku symulacji, na podstawie założeń jednej z dwóch wersji osobniczego modelu optymalizacyjnego: pierwszego, zakładającego perfekcyjną wiedzę każdego osobnika zgodnie z założeniami podstawowej wersji koncepcji *IIFD* (tj. gdy osobniki zawsze odnajdują głębokość gwarantującą najwyższe tempo wzrostu wynikające ze stężenia pokarmu, zagęszczenia własnej populacji oraz wielkości własnego ciała), lub drugiego, zakładającego, że osobniki nie mają kompletnej wiedzy o stężeniu pokarmu na różnych głębokościach w słupie wody. **Trzecia** hipoteza postulowała, że zarówno rozmieszczenie osobników młodych, jak i dojrzałych, w samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony ryby planktonożernej w eksperymentach rzeczywistych, pokrywa się z rozmieszczeniem wirtualnych osobników powstałym w wyniku symulacji na podstawie jednego z czterech scenariuszy założeń modelowych powstałych z każdej możliwej kombinacji dwóch założeń: po pierwsze, że kształt odpowiedzi funkcjonalnej ryby jest zgodny z przebiegiem II lub III typu oraz, po drugie, że osobnik ma, lub nie ma, perfekcyjnej wiedzy o ryzyku śmierci na każdej głębokości. **Czwarta** hipoteza przewidywała, że zarówno rozmieszczenie młodych osobników, jak i dojrzałych, w różnym zagęszczeniu ich populacji, w nakładających się na siebie dwóch gradientach w eksperymentach rzeczywistych pokrywa się z rozmieszczeniami wirtualnych osobników powstałymi w wyniku symulacji na podstawie założeń jednej z czterech wersji osobniczego modelu optymalizacyjnego, różniących się każdą możliwą kombinacją dwóch założeń, po pierwsze, że kształt odpowiedzi funkcjonalnej ryby jest zgodny z przebiegiem II lub III typu oraz, po drugie, że osobnik ma lub nie ma perfekcyjnej wiedzy o ryzyku śmierci i stężeniu pokarmu na każdej głębokości.

**Tabela 1.** Prace eksperymentalne, w których wyznaczono kształt odpowiedzi funkcjonalnej różnych gatunków ryb planktonożernych żerujących pojedynczo w małym zbiorniku eksperymentalnym (V zbiornika) na różnym typie ofiary rozmieszczonej homogennie (-) w eksperymentach z uzupełnianiem (+) lub bez uzupełniania (-) zjedzonych ofiar w trakcie eksperymentu

Praca	Gatunek ryby	Ofiara	Uzupełnianie ofiar	Kształt odpowiedzi	V zbiornika (L)	Heterogenność rozmieszczenia ofiar
Ivlev, 1961	Ukleja <i>Alburnus alburnus</i>	<i>D. magna</i>	-	II	30	-
Heller i Milinski, 1979	Ciernik <i>Gasterosteus aculeatus</i>	<i>D. magna</i>	-	II	3	-
Townsend i Risebrow, 1982	Leszcz <i>Abramis brama</i>	<i>D. magna</i>	-	II/III	2	-
Bence i Murdoch, 1986	Gambuzja pospolita <i>Gambusia affinis</i>	<i>D. magna</i>	-	II	32	-
Godin i Smith, 1988	Gupik <i>Poecilia reticulata</i>	<i>D. magna</i>	-	II	40	-
Winkler i Orellana, 1992	Leszcz <i>Abramis brama</i>	<i>D. hyalina</i> <i>L. kindtii</i>	-	II/III	20	-
Winkler i Orellana, 1992	Płoc <i>Rutilus rutilus</i>	<i>D. hyalina</i> <i>L. kindtii</i>	-	II/III	20	-
Koski i Johnson, 2002	Nerka <i>Oncorhynchus nerka</i>	<i>D. pulex</i> <i>D. galeata</i>	-	II	35	-
Galarowicz i Wahl, 2005	Sander <i>Sander vitreus</i>	<i>D. magna</i>	-	II	30	-
Rygielska-Szymańska, 2009	Płoc <i>Rutilus rutilus</i>	<i>D. hyalina</i>	+	II	50	-
Vollset i Bailey, 2011	Ciernik <i>Gasterosteus aculeatus</i>	<i>Artemia</i>	+	II	20	-
Murray i in., 2013	Płoc <i>Rutilus rutilus</i>	<i>D. magna</i>	-	II	20	-

## II. Materiał i metody

### II.1. Ogólny plan badań

Hipoteza "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji" weryfikowana była poprzez: (1) ustalenie warunków w eksperymentach wirtualnych i w eksperymentach laboratoryjnych; (2) skonstruowanie optymalizacyjnego modelu symulacyjnego w języku programowania NetLogo; (3) konstrukcję trzech kolejno udoskonalanych układów eksperymentalnych niezbędnych dla badania rozmieszczenia zwierząt planktonowych (układu poziomego, układu wstępnego pionowego i układu pionowego właściwego); (4) przeprowadzenie eksperymentów laboratoryjnych dla parametryzacji modelu; (5) wygenerowanie symulacji z wykorzystaniem programu napisanego w języku NetLogo; (6) przeprowadzenie eksperymentów laboratoryjnych (w układach eksperymentalnych dla badania rozmieszczenia *Daphnia*) w takich samych warunkach środowiska eksperymentalnego, i dla tych samych klas wiekowych *Daphnia*, co w eksperymentach wirtualnych; (7) weryfikacja hipotezy rozprawy poprzez skonfrontowanie ze sobą rozmieszczeń *Daphnia* w eksperymentach rzeczywistych z ich rozmieszczeniami w eksperymentach wirtualnych, wygenerowanych na podstawie każdej z czterech wersji założeń modelowych (uwzględniających II lub III typ odpowiedzi funkcjonalnej oraz „*Daphnia* bezbłędna” lub popełniającą błędy).

Ze względu na obszerny materiał zebrany podczas realizacji projektu rozprawy postanowiłem w samej rozprawie ograniczyć się jedynie do opisu tej części materiału, która była niezbędna dla weryfikacji hipotezy "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji". Planuję, że materiał ten zostanie opublikowany w dwóch pracach złożonych do czasopism z Listy Filadelfijskiej: **po pierwsze**, głównej pracy przygotowywanej w trakcie realizacji rozprawy, opisującej eksperymentalną weryfikację hipotezy (Maszczyk i in., w przygotowaniu, Załącznik 2), **po drugie**, pracy metodologicznej opisującej właściwy pionowy układ eksperymentalny dla badania rozmieszczenia zwierząt planktonowych na poziomie populacji oraz wyboru głębokości przez pojedynczego osobnika w stabilnych gradientach pokarmu, informacji o niebezpieczeństwie ze strony ryby planktonożerne, temperatury oraz promieniowania UV (Maszczyk 2016, Załącznik 3).

Pozostała część materiału, która wyrosła z potrzeby realizacji projektu rozprawy, ale dotyczy wątków pobocznych, została już opublikowana w 7 innych pracach oryginalnych, które załączam do treści rozprawy bez szczegółowego opisu ich treści, ale z odwołaniem się do nich we wstępie, metodach i dyskusji rozprawy. **Pierwszą** z nich jest obszerna praca

konceptyjno-przeglądowa (Maszczyk 2008, Załącznik 1), prezentująca polskiemu czytelnikowi podstawowe założenia koncepcji rozmieszczenia idealnie swobodnego i metody ich eksperymentalnej weryfikacji w oparciu o obszerną literaturę przedmiotu zebraną w trakcie przygotowań do napisania projektu, który był głównym źródłem finansowania badań realizowanych w ramach projektu rozprawy (Grant N N304 067336, 2009 – 2012). **Druga** praca opisuje wyniki eksperymentów dotyczących synergicznego oddziaływania chemicznej informacji o obecności drapieżcy – ryby planktonożernej (kairomonów) i chemicznej informacji o zagęszczeniu populacji *Daphnia* na jej tempo wzrostu, zmiany historii życia i wybór głębokości (Gliwicz, Maszczyk, Uszko 2012, Załącznik 4). Pierwotnie, wyniki tych eksperymentów miały posłużyć do parametryzacji modelu poprzez wyznaczenie na ich podstawie zależności między zagęszczeniem populacji a tempem wzrostu *Daphnia* w obecności kairomonów, ale ostatecznie z kilku powodów (między innymi ze względu na zastosowanie zbyt wysokiego stężenia kairomonów w tych eksperymentach w stosunku do stężenia kairomonów w eksperymentach dla weryfikacji przewidywań modelowych oraz do hipotetycznego ich stężenia w jeziorach) przestałem jedynie na krótkim odwołaniu się do wyników tej pracy w dyskusji rozprawy. **Trzecia** (Maszczyk i Bartosiewicz 2012, Załącznik 5) dotyczy eksperymentalnego wyznaczenia rzeczywistego efektu, jaki wywołuje chemiczny sygnał o obecności drapieżcy - ryby planktonożernej (tak zwany kairomon, zawarty w wodzie, w której przed eksperymentem znajdowała się ryba) na tempo wzrostu i zmiany historii życia *Daphnia*, poprzez oddzielenie go od efektu wywołanego przez dodatkowy pokarm bakteryjny towarzyszący obecności ryby. Praca ta weryfikuje wyniki licznych prac kairomonowych dotyczących zmian historii życia i tempa wzrostu *Daphnia* pod wpływem wody z hodowli ryb planktonożernych, a także wskazuje na to, że gatunki mniejsze, mniej narażone na drapieżnictwo ryb, są lepiej przystosowane do korzystania z pokarmu towarzyszącemu obecności ryby, co może mieć znaczenie adaptatywne. Praca ta ma również znaczenie metodyczne dla weryfikacji głównej hipotezy rozprawy, ponieważ na podstawie wyników eksperymentów opisanych w tej pracy opracowany został system przygotowywania mediów, wykorzystywanych w eksperymentach dla parametryzacji modelu i weryfikacji jego prognoz. Opracowanie takiego systemu było ważne tym bardziej, że w większości eksperymentów wykorzystywana była woda z kairomonami, która powinna być pozbawiona dodatkowego pokarmu bakteryjnego. Opracowanie systemu polegało, po pierwsze, na ustaleniu wielkości por sączków użytych do filtrowania wody przy tworzeniu mediów eksperymentalnych na 0,20  $\mu\text{m}$ , co umożliwiło zatrzymywanie większości bakterii, które mogłyby stać się alternatywnym lub uzupełniającym pokarmem dla pokarmu



glonowego dla *Daphnia* w eksperymencie, a po drugie, na ustaleniu maksymalnego czasu (8 godzin) między koniecznością przygotowywania kolejnych mediów do eksperymentu tak, aby przyrost pokarmu bakteryjnego w medium nie wpływał istotnie na tempo wzrostu i wybór głębokości przez *Daphnia*. **Czwarta** praca (Bartosiewicz, Jabłoński, Kozłowski, Maszczyk 2015, Załącznik 6) powstała na podstawie powtórnej analizy danych, które były podstawą do napisania trzeciej pracy (Maszczyk i Bartosiewicz 2012). Opisana jest w niej eksperymentalna weryfikacja hipotezy, że w zakresie stężenia pokarmu spotykanego w typowym, nizinnym, dimiktycznym jeziorze strefy umiarkowanej, inwestycja w potomstwo u zwierząt planktonowych może być limitowana przez ograniczenia wynikające z objętości komory łęgowej, a nie tylko bezpośrednio przez stężenie pokarmu. **Piąta** praca (Gliwicz, Maszczyk, Jabłoński, Wrzosek 2013, Załącznik 7) dotyczy eksperymentalnej weryfikacji hipotezy, że tworzenie skupisk przez zwierzęta planktonowe w przestrzeni horyzontalnej nie jest adaptatywne, ponieważ w takim skupisku jest większe ryzyko śmierci *per capita* w wyniku intensyfikacji żerowania ryb planktonożernych. **Szósta** praca (Maszczyk i Gliwicz 2014, Załącznik 8) dotyczy eksperymentalnej weryfikacji hipotezy, że heterogenne rozmieszczenie zooplanktonu oraz wielkość układu eksperymentalnego wpływają na selektywność pokarmową ryb planktonożernych. Zarówno piąta, jak i szósta praca powstała na podstawie danych otrzymanych w eksperymentach przeprowadzonych w akwarialni w Stacji Hydrobiologicznej w Pilchach, czyli w pomieszczeniu zbudowanym ze ścian z moskitiery i pokrytym przez przezroczysty dach dla odtworzenia naturalnych warunków temperatury i oświetlenia oraz dla wyeliminowania w eksperymencie drapieżnictwa bezkręgowców (Gliwicz i Wrzosek 2008). Eksperymenty te pierwotnie miały posłużyć dla wyznaczenia kształtu odpowiedzi funkcjonalnej ryb planktonożernych, ale ze względu na duży rozrzut wyników postanowiłem wyznaczyć je w dodatkowych eksperymentach w ściśle kontrolowanych warunkach w laboratorium w budynku Centrum Nauk Biologiczno - Chemicznych (CENT3). Początkowo wyniki eksperymentów opisanych w **siódmej** pracy (Maszczyk, Bartosiewicz, Jurkowski, Wyszomirski 2014, Załącznik 9) miały posłużyć do sparametryzowania zależności między siłą konkurencji przez interferencję między rybami a ich zagęszczeniem. Zależność ta miała być wprowadzona do modelu, aby poprzez wyznaczenie kształtu odpowiedzi numerycznej ryb, ustalić zależne od zagęszczenia ryb ryzyko śmierci *per capita* dla *Daphnia*. Jednak efekt interferencji w zakresie zagęszczeń ryb spotykanych w jeziorze okazał się na tyle niewielki, że wprowadzanie tej zależności do modelu okazało się zbędne.

## II.2. Szczegółowy plan badań

### II.2.1. Ustalenie warunków eksperymentalnych

Pomimo tego, że w ramach realizacji projektu rozprawy przeprowadzone zostały różnorodne eksperymenty laboratoryjne różniące się zarówno pod względem przeznaczenia (eksperymenty dla parametryzacji modelu i eksperymenty dla weryfikacji prognoz modelowych), obiektu badań (ryby, *Artemia* lub *Daphnia*), zastosowanego układu eksperymentalnego jak też rodzaju efektu wywołanego u zwierząt eksperymentalnych (wpływ na zachowanie lub na zmiany historii życia), to wszystkie charakteryzowały się również pewnymi wspólnymi cechami.

Pierwszą wspólną cechą eksperymentów było to, że zostały tak zaplanowane, aby możliwe było zbadanie za ich pomocą efektu wielkości ciała *Daphnia* i zagęszczenia jej populacji oraz wpływu ryzyka śmierci i stężenia pokarmu w ściśle kontrolowanych warunkach, poprzez wyeliminowanie czasowej i przestrzennej zmienności pozostałych cech środowiska (temperatury, stężenia tlenu, natężenia promieniowania UV, obecności chemicznej informacji o obecności drapieżników bezkręgowych, jakości pokarmu glonowego dla *Daphnia*), które są obecne w warunkach naturalnych (zmienność przestrzenna, dobowa i sezonowa w słupie wody w jeziorze) i mogłyby wpłynąć na wynik eksperymentu. Dla wyeliminowania zróżnicowania czasowego i przestrzennego temperatury, większość eksperymentów (oprócz tych, przeprowadzonych w warunkach naturalnych temperatury i światła na terenie Stacji Hydrobiologicznej w Pilchach i nieopisywanych w wynikach rozprawy) przeprowadzona została w klimatyzowanych laboratoriach w temperaturze 21°C. Stałe i wysokie stężenie tlenu ( $10 \pm 0,8 \text{ mg O}_2 \times \text{L}^{-1}$ ) w mediach eksperymentalnych (zmierzone losowo w 3 właściwych eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych – w każdym na początku i pod koniec eksperymentu) otrzymywane było zarówno poprzez napowietrzanie wody wykorzystywanej do tworzenia mediów co najmniej dobę przed wykorzystaniem jej w eksperymencie, jak również poprzez mieszanie samych mediów w trakcie trwania eksperymentu za pomocą mieszadeł magnetycznych. Ze względu na zastosowanie we wszystkich eksperymentach źródeł światła emitujących światło jedynie w zakresie widzialnym, wyeliminowany został efekt promieniowania UV na zachowanie i zmiany historii życiowych *Daphnia*. Co prawda, we wszystkich eksperymentach została zastosowana woda jeziorna do tworzenia mediów, ale wyeliminowany został z niej sygnał chemiczny o obecności drapieżników bezkręgowych poprzez wykorzystywanie w

eksperymentach wody przefiltrowanej przez filtry  $0,2\ \mu\text{m}$  i odstanej co najmniej 14 dni przed każdym eksperymentem, co jest wystarczającym okresem, aby związki chemiczne niosące taką informację się dezaktywowały (Loose i in. 1993). Zróżnicowanie w jakości pokarmu glonowego podawanego w mediach eksperymentalnych zostało zminimalizowane zarówno poprzez zastosowanie w eksperymentach przeprowadzonych na *Daphnia* tego samego szczepu glonów (*Acutodesmus obliquus*), jak również konsekwentną wymianę mediów co 4-8 godzin, zastosowanie dużej i tej samej prędkości przepływu dostarczanego medium we wszystkich eksperymentach przepływowych ( $180\ \text{ml} \times \text{h}^{-1}$ ) i mieszanie mediów eksperymentalnych w trakcie trwania każdego eksperymentu.

Druga wspólną cechą wszystkich eksperymentów było to, że zostały tak zaplanowane, aby warunki w nich stworzone były: **po pierwsze**, realistyczne, czyli z jednej strony, zawierały się w zakresie wartości, z którymi *Daphnia* mogłyby się spotkać w warunkach naturalnych, z drugiej strony, wykorzystany w eksperymentach klon *Daphnia* pochodził ze środowiska, w którym współwystępował z rybami; **po drugie**, typowe, czyli w przypadku eksperymentów przeprowadzonych w gradiencie pokarmu i w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy wartości każdego z dwóch gradientów były najwyższe w warstwach przy powierzchniowych; **po trzecie**, podobne w eksperymentach dla parametryzacji modelu i w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych.

Ponieważ celem rozprawy jest zbadanie hipotezy "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji", a nie sprawdzenie, czy w konkretnym scenariuszu w jeziorze rozmieszczenie osobników w populacji *Daphnia* jest wynikiem decyzji optymalizacyjnych, kombinacja wybranych cech środowiska i populacji zastosowana w eksperymentach musiała być realistyczna i typowa dla warunków naturalnych, ale nie musiała wiernie odzwierciedlać kombinacji tych cech z jakiegoś wybranego scenariusza (w konkretnym czasie i w konkretnym jeziorze). Pomimo tego, dla pokazania potencjalnych możliwości układu eksperymentalnego (finalnej wersji pionowych kolumn, zobacz *Materiał i metody*, II.2.3.4) zarówno gradient pokarmu, jak i gradientu informacji o niebezpieczeństwie zostały odwzorowane względem konkretnego scenariusza (Rys. 2). Wzorcowym scenariuszem stały się fizyczne, chemiczne i biologiczne parametry w słupie wody dobrze poznanego eutroficznego jeziora Roś (Wielkie Jeziora Mazurskie) na stanowisku o głębokości 23 m, w pochmurny dzień w połowie września 2012. W jeziorze tym występują liczne gatunki ryb planktonożernych, w tym wzdrega - *Scardinius erythrophthalmus* (Jachner 1991). Gradient pokarmu odtworzony był na wzór przebiegu gradientu stężenia glonów z maksimum w warstwach przy powierzchniowych (Rys. 2), wyznaczonego za pomocą

wieloparametrycznej sondy *Manta 2* tak, że warunki w każdym sektorze wirtualnego i rzeczywistego układu odpowiadały uśrednionym warunkom z każdego kolejnego 1,5 metrowego przedziału głębokości słupa wody w jeziorze (1 metr wirtualnego układu eksperymentalnego odpowiadał 15 metrom w jeziorze). Gradient informacji o niebezpieczeństwie był zasymulowany gradientem natężenia i spektrum światła, wyznaczonych za pomocą spektrofotometru światłowodowego (*USB2000-UV-VIS*), również w skali 1:15 względem warunków w jeziorze Roś (Rys. 2).

We wszystkich eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych oraz w większości eksperymentów dla parametryzacji modelu (oprócz eksperymentów dla wyznaczenia kształtu odpowiedzi numerycznej i funkcjonalnej ryby planktonożernej) wykorzystane zostały osobniki jednego klonu *Daphnia longispina* (L 004), rozchodowane z jednego osobnika, wyizolowanego we wrześniu 2012 r. z J. Roś. *D. longispina* należy do największych wioślarek, które często współwystępują z rybami i jest gatunkiem typowym dla jezior strefy umiarkowanej. Zgodnie z literaturą przedmiotu zmieniała się w ostatnich latach systematyka *Daphnia*, dwa gatunki *D. hyalina* i *D. longispina* zostały połączone w jeden gatunek *D. longispina* (Petrusek i in. 2008), co zauważyłem dopiero po opublikowaniu kilku prac opisujących wyniki zawarte w rozprawie (*D. hyalina*, w Gliwicz i in. 2013, Załącznik 7; Maszczyk i Gliwicz 2014, Załącznik 8), stąd rozbieżność między nazewnictwem gatunku *Daphnia* w tych publikacjach i w samej rozprawie doktorskiej, w której zastosowana została nowa klasyfikacja systematyczna (*D. longispina*).

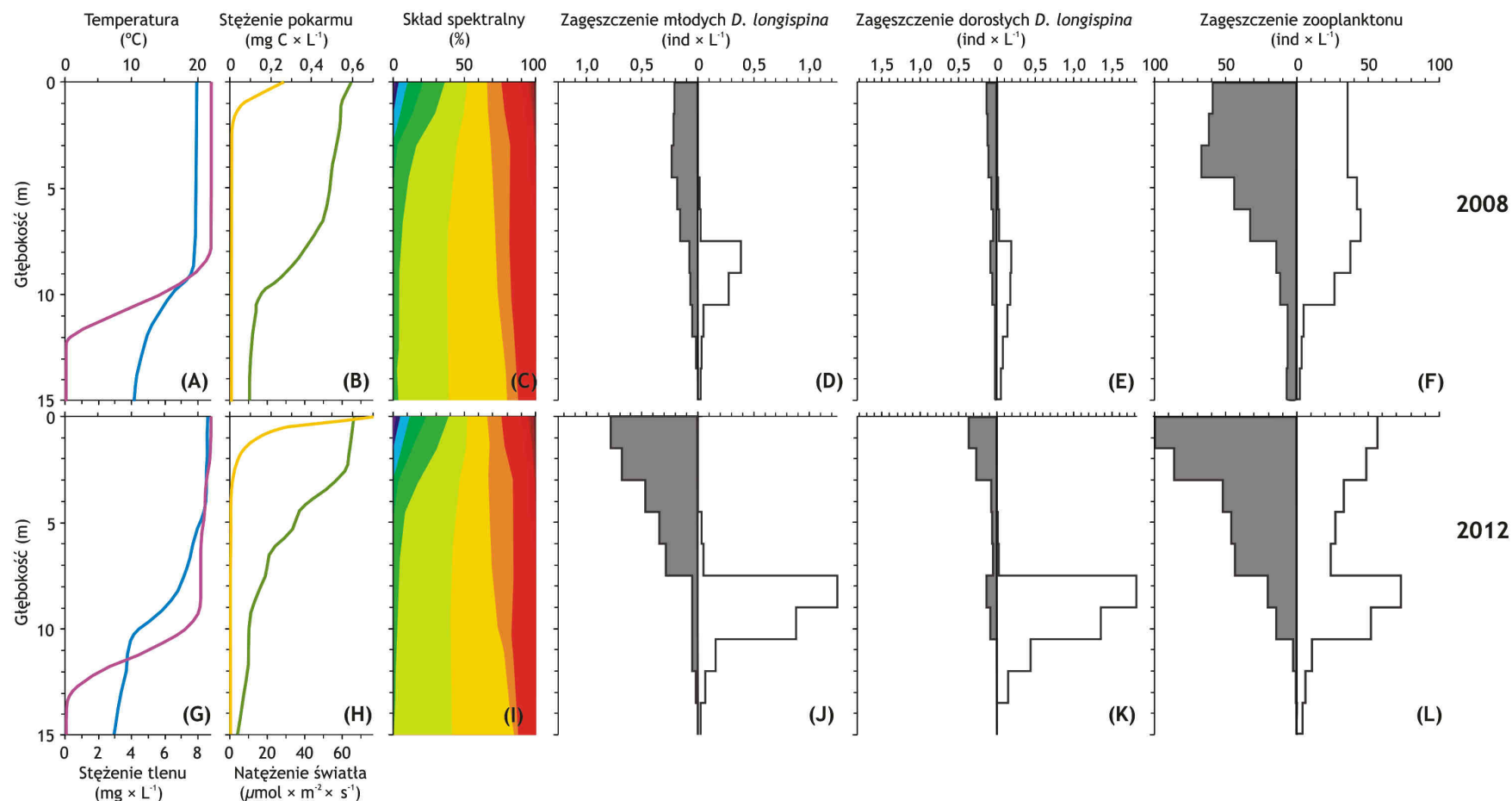
W większości eksperymentów zastosowany został zakres zagęszczeń *Daphnia* od 1 do 100 osobników na litr (jedynie w eksperymentach dla wyznaczenia zależności tempa wzrostu od zagęszczenia *Daphnia* i stężenia pokarmu dodatkowo przeprowadzone zostały eksperymenty w wyższych zagęszczeniach, *Materiał i metody*, II.2.4.2). Dolny zakres zagęszczeń został dobrany tak, aby odpowiadał zagęszczeniom *D. longispina* z J. Roś (Rys. 2) i był reprezentatywny dla zagęszczeń tego gatunku w większości innych typowych jezior strefy umiarkowanej (Gliwicz 2003). Górny zakres zagęszczeń ( $100 \text{ osobn.} \times \text{L}^{-1}$ ) jest natomiast bardzo zawyżony względem zagęszczeń tego gatunku w jeziorach, ale odpowiada średniemu zagęszczeniu mezozooplanktonu (przedstawicieli wielu grup taksonomicznych zooplanktonu, który jest podstawowym pokarmem ryb planktonożernych w jeziorze Roś - Rys. 2 oraz w większości innych typowych jezior strefy umiarkowanej, Gliwicz 2003). W opisie wyników zastosowany został termin „zagęszczenie populacji”, pomimo tego, że eksperymenty dotyczące rozkładów pionowych przeprowadzane były zawsze tylko z wykorzystaniem równowiekowej klasy osobników. Zarówno eksperymenty wirtualne, jak

również rzeczywiste, przeprowadzone zostały dla dwóch takich klas, pierwszej złożonej z osobników 2,5 dniowych, umownie nazwanych młodymi, i drugiej złożonej z osobników 5,5 dniowych, umownie nazwanych dojrzałymi, pomimo tego, że tylko u niektórych osobników w trakcie eksperymentu pojawiały się jaja w pierwszej kładce.

W większości eksperymentów dla wyznaczenia kształtu odpowiedzi funkcjonalnej oraz numerycznej (eksperymenty przeprowadzone w dużym układzie eksperymentalnym w budynku Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, CENT 3) ofiarą dla ryby planktonożernej była 6-dniowa *Artemia salina*, wykluta z jaj przetrwanych, pochodzących z Wielkiego Słonego Jeziora w Utah (USA), pakowanych przez firmę Sanders, której masa jest porównywalna do masy osobników 0,5-dniowych klonu L 004 *D. longispina*, odpowiednio  $2,64 \pm 0,42$  mg i  $2,5 \pm 0,58$  mg suchej masy. *Daphnia* została tu zastąpiona naupliusami *Artemia*, ponieważ w warunkach laboratoryjnych tylko jej hodowla umożliwia wyprodukowanie kilku-kilkudziesięciu tysięcy ofiar, które były niezbędne w każdej codziennej sesji pokarmowej. Pokarmem glonowym dla *Daphnia* (i *Artemia*), wykorzystywanym w większości eksperymentów dla parametryzacji modelu oraz weryfikacji prognoz modelowych, była jednokomórkowa zielenica *Acutodesmus obliquus*. Wyjątkiem były eksperymenty przeprowadzone we wstępnym układzie pionowych kolumn dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.3.3), w których wykorzystana została drobniejsza jednokomórkowa zielenica *Chlamydomonas reinhardtii*, która dzięki obecności wici ma zdolność aktywnego unoszenia się w wodzie. Drapieżnikiem, zarówno tym wywołującym śmiertelność (w eksperymentach dla wyznaczenia ryzyka śmierci oraz dla wyznaczenia kształtu odpowiedzi funkcjonalnej i numerycznej), jak również tym wywołującym reakcję obronną (we wszystkich eksperymentach wzrostowych oraz dotyczących wyboru głębokości przez *Daphnia*) wykorzystana została 6-8 cm młodociana wzdreğa, jako typowa ryba planktonożerna.

Przy tworzeniu mediów eksperymentalnych, we wszystkich eksperymentach dla badania tempa wzrostu i wyboru miejsca przez *Daphnia*, wykorzystywana była woda jeziorna (z jednego z dwóch jezior eutroficznych: Góra - 52°26' N 20°47' E lub Szczęśliwickiego - 52°12' N 20° 57' E), która po przywiezieniu z jeziora była przefiltrowana (filtry o porach 0,2  $\mu$ m, Sartorius), odstana (co najmniej 14 dni przed rozpoczęciem eksperymentu) i napowietrzana dla wyeliminowania chemicznej informacji o zagęszczeniu zwierząt planktonowych i informacji o obecności drapieżników kręgowych i bezkręgowych - kairomonów (Loose i in. 1993). Dobę przed rozpoczęciem każdego eksperymentu część wody przenoszona była do dwóch oddzielnych zbiorników, do jednego z nich wpuszczane były

ryby (6-8 cm wzdręgi), produkujące kairomon, a do drugiego *Daphnia*, produkujące chemiczną informację o zagęszczeniu populacji. Woda w każdym z trzech zbiorników była tak samo napowietrzana i przetrzymywana w laboratorium w takich samych warunkach temperatury (21°C) i fotoperiodu (16 D : 8 N). Podczas przygotowywania mediów eksperymentalnych woda z każdego zbiornika była filtrowana osobno przez filtry o drobnych porach (0,2  $\mu\text{m}$ ), zatrzymujące większość biomasy bakterii (Maszczyk i Bartosiewicz 2012, Załącznik 5), a następnie woda z każdego z nich mieszana była w takich proporcjach, aby stężenie kairomonu w finalnym medium odpowiadało zawsze 1 rybie na 100 litrów wody, natomiast stężenie chemicznej informacji o zagęszczeniu populacji odpowiadało zagęszczeniu *Daphnia* w każdym wariancie eksperymentalnym. W eksperymentach przeprowadzonych dla wyznaczenia rzeczywistego kształtu odpowiedzi funkcjonalnej i numerycznej ryb planktonożernych, przeprowadzonych w laboratoriach budynku Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych (CENT 3), wykorzystano odstaną (co najmniej 48 godzin) wodę kranową przepuszczoną przed eksperymentem przez oczyszczalnię biologiczną z osadem czynnym.



**Rys. 2.** Warunki panujące w jeziorze Roś: gradient termiczny (A, G, niebieska linia), gradient stężenia tlenu (A, G, fioletowa linia), gradient natężenia światła (B, H, żółta linia), gradient koncentracji węgla organicznego (B, H, zielona linia), gradient spektrum światła (C, I) oraz profil pionowy rozmieszczenia młodych *Daphnia longispina* (D, J), dojrzałych (E, K) i wszystkich łącznie zwierząt planktonowych należących do mezoplanktonu (0,2 – 20 mm, Kajak 1998, F, L) w słupie wody eutroficznego J. Roś we wrześniu 2008 (górny panel, A-F) i we wrześniu 2012 (dolny panel G-L). Do mezoplanktonu zostały zaliczone zwierzęta, które są typowym pokarmem ryb planktonożernych (*Daphniidae*, *Bosminidae*, *Chydoridae*, *Chaoboridae* oraz rzędów *Cyclopoida* i *Calanoida*). Granicą między osobnikami zaliczonymi do młodych i dojrzałych była wielkość ciała najmniejszej matki z jajami znalezionej w próbach planktonowych.

### II.2.2. Model symulacyjny

Dla weryfikacji hipotezy został skonstruowany prosty, optymalizacyjny model osobniczy w przyjaznym dla użytkownika języku programowania NetLogo. Jest to najpopularniejsze narzędzie wykorzystywane w różnych dziedzinach badań naukowych i w dydaktyce dla tworzenia modeli symulacyjnych, tak zwanych wieloagentowych (DeAngelis i Grimm 2014). W symulacji wieloagentowej podstawową jednostką jest agent. W badaniach ekologicznych, zamiast modelu agentowego, częściej używa się pojęcia modelu osobniczego (*individual based model*), w którym podstawową jednostką jest osobnik (DeAngelis i Grimm 2014). Agent/osobnik może być obdarzony cechami (na przykład wielkością ciała), działa w środowisku, z którym wchodzi w interakcje (w tym wchodzi w interakcje z innymi agentami/osobnikami) i jest zdolny do podejmowania autonomicznych decyzji (w tym decyzji optymalizacyjnych). Ponieważ NetLogo posiada wiele udogodnień pozwalających na łatwe tworzenie modeli agentowych, wydało się ono właściwym narzędziem dla konstrukcji modelu, który pozwolił na weryfikację hipotez rozprawy.

Skonstruowany model był dyskretny, czyli taki, w którym wszystkie cechy środowiska wirtualnego (gradient pokarmu, natężenie i spektrum światła) oraz zagęszczenie wirtualnych *Daphnia* zmieniają się skokowo między każdym z 10 sektorów jednej pionowej kolumny ( $H = 100$  cm słupa wody,  $L = 12,5$  cm i  $W = 4,0$  cm,  $V = 5L$ ), której wielkość odzwierciedlała wielkość obydwu kolumn trzeciej wersji pionowego układu eksperymentalnego dla zbadania rozmieszczenia zwierząt planktonowych (*Materiał i metody*, II.2.3.4). Model ten był również dyskretny ze względu na czas, który w symulacjach był reprezentowany przez poszczególne momenty, w których wirtualne zwierzęta mogły się przemieszczać.

Większość zależności wprowadzonych do modelu została sparametryzowana (Tabela 2) na podstawie specjalnie dla tego celu przeprowadzonych eksperymentów laboratoryjnych (*Materiał i metody*, II.2.4). Choć takie rozwiązanie było bardziej czasochłonne niż parametryzacja modelu jedynie za pomocą danych literaturowych i za pomocą prób wziętych z jeziora, pozwoliło ono na przeprowadzenie symulacji uwzględniając możliwie dokładnie wpływ konkretnych elementów środowiska na dostosowanie *Daphnia* należących do klonu użytego w eksperymentach i tym samym pozwoliło na wiarygodne porównanie rozkładów powstałych na podstawie modelu symulacyjnego z rozkładami rzeczywistymi. Również przebieg gradientów i każda inna cecha środowiska wirtualnego (np. podzielenie słupa wody na 10 sektorów, wykorzystanie w eksperymentach dwóch klas wiekowych *Daphnia* – młodych i dojrzałych) była ustalona tak, aby było możliwe stworzenie analogicznych warunków w rzeczywistym laboratoryjnym układzie eksperymentalnym, i tym samym, aby



było możliwe zweryfikowanie w nim przewidywań modelowych. Choć nie zmienia to faktu, że skonstruowany model był modelem *a priori*, należy zauważyć, że w finalnym zestawie symulacji wirtualnych dystrybucji, warunki środowiskowe oraz cechy zwierząt eksperymentalnych stworzone w każdej pojedynczej symulacji odzwierciedlały te same warunki i cechy w eksperymentach rzeczywistych przeprowadzonych dla weryfikacji prognoz modelowych, a nie odwrotnie. Takie rozwiązanie zostało wybrane, ponieważ niewspółmiernie trudniej byłoby odtworzyć w eksperymencie rzeczywistym warunki (przede wszystkim gradient pokarmu glonowego) z symulacji, niż odwrotnie.

Powstały 4 wersje modelu, różniące się zestawem założeń dotyczących tego, czy osobnik bezbłędnie odnajduje najkorzystniejszą dla siebie głębokość, i tego, jakiego typu (II lub III) jest kształt odpowiedzi funkcjonalnej ryby (tj. zależność zmiany tempa jej żerowania od zagęszczenia planktonowej ofiary). Charakterystyka każdej z 4 wersji modelu została opisana w tym rozdziale (*Materiał i metody*, II.2.2), jak również w rozdziale II.2.6 *Materiału i metod*. W tym rozdziale została również opisana metoda wprowadzenia błędu oraz wprowadzenia różnych typów (II i III) odpowiedzi funkcjonalnej do modelu.

W symulacjach (eksperymentach wirtualnych tak, jak w eksperymentach rzeczywistych) rozważane było jedynie pionowe przemieszczanie się osobników. W każdej symulacji wprowadzana była grupa identycznych osobników, odpowiadających 2,5- lub 5,5-dniowej *D. longispina* wykorzystanej w eksperymentach rzeczywistych. Na początku każdego eksperymentu wprowadzana była do środkowego sektora (piątego z dziesięciu licząc od góry) określona liczba osobników w zakresie od 1 do 400 (średnie zagęszczenie w kolumnie od 0,25 do 100 osobn.  $L^{-1}$ ). Pojedynczy osobnik podczas symulacji w każdym kroku czasowym mógł podjąć decyzję, czy pozostać na obecnej głębokości, czy przemieścić się na jedną z sąsiednich głębokości (w przypadku sektorów skrajnych pozostać lub przemieścić się na sąsiednią głębokość). Dla każdej z dwóch klas wiekowych każda symulacja przeprowadzana była dla jednego z czterech wariantów: (1) w nieobecności któregośkolwiek gradientu, (2) tylko w obecności gradientu pokarmu, (3) tylko w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy, i (4) w obydwu nakładających się na siebie gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa (uzasadnienie liczby powtórzeń dla każdej sekwencji wariantów jest opisane w podrozdziale II.2.6 *Materiału i metod*).

W finalnym zestawie symulacji (dla każdego z 4 zestawów założeń) rozmieszczenia wirtualnych *Daphnia* (które porównane zostały z dystrybucjami otrzymanymi w finalnym zestawie eksperymentów rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych, *Materiał i metody*, II.2.6), dla każdej pojedynczej symulacji odtworzony został indywidualny gradient

pokarmu, który odzwierciedlał przebieg tego gradientu w pojedynczym, odpowiadającym danej symulacji (przeprowadzonym w takich samych warunkach środowiska), eksperymencie rzeczywistym. Zgodnie z założeniem interferencyjnego rozmieszczenia idealnie swobodnego (*IIFD*, Tregenza 1995a), gradient pokarmu nie zmieniał się w trakcie żadnej z symulacji i nie zależał od wielkości i zagęszczenia wirtualnych osobników. Gradient informacji o niebezpieczeństwie był symulowany gradientem natężenia i spektrum światła, które odtworzone zostały tak samo w każdej symulacji na wzór średniego przebiegu tych gradientów (uśrednionego dla obydwu kolumn) w trzeciej (właściwej) wersji pionowego układu eksperymentalnego (*Materiał i metody*, II.2.3.4).

Każdy osobnik w symulacji w każdym kroku czasowym maksymalizował swoje dostosowanie, mierzone (w sektorze, w którym się znajdował) stosunkiem indywidualnego tempa wzrostu ( $Gr$ ) do ryzyka śmierci *per capita* ( $M_t$ ) na podstawie zmodyfikowanej reguły minimalizacji  $M \times Gr^{-1}$  Wernera i Gilliana (1984) z tym, że **w pierwszej wersji modelu** szacował swoje dostosowanie bezbłędnie, a **w drugiej wersji**, popełniał zarówno błędy przy szacowaniu tempa wzrostu, jak również przy szacowaniu ryzyka śmierci (dla przejrzystości, przypomnieć należy, że 4 wersje założeń modelowych biorą się stąd, że każda z 2 wersji modelu różniących się założeniem dotyczącym zdolności do szacowania zasobności, została przeprowadzona przy założeniu, że odpowiedź funkcjonalna ryby jest zgodna z II lub z III typem). Pierwsza wersja była zgodna z dwoma głównymi założeniami podstawowej wersji koncepcji *IFD* (w tym *IIFD*), zgodnie z którą każdy osobnik ma kompletną wiedzę o jakości każdego miejsca i perfekcyjnie szacuje zasobność każdego z nich oraz ma pełną swobodę w przemieszczaniu się między miejscami. W każdej symulacji powstałej na podstawie tej wersji modelu, w każdym wariancie eksperymentalnym i przy każdym zagęszczeniu populacji *Daphnia* oraz dla każdej z dwóch klas wiekowych, poszukiwane było takie rozmieszczenie, które gwarantowało każdemu osobnikowi najwyższe dostosowanie. Było to możliwe, ponieważ każdy osobnik był zdolny do perfekcyjnego oszacowania potencjalnego tempa wzrostu na każdej głębokości, uwzględniając każdą z trzech zmiennych, które wpływają na tempo wzrostu (stężenia pokarmu, zagęszczenie populacji oraz swoją wielkość/wiek). W przypadku szacowania ryzyka śmierci, jego perfekcja polegała natomiast nie tylko na tym, że prawidłowo odbierał zmysłami i zapamiętywał rozkład (gradient) natężenia i składu spektralnego światła oraz stężenia kairomonów rybich, ale również bezbłędnie „interpretował” rzeczywiste ryzyko śmierci na podstawie informacji o tym ryzyku. W pozostałych trzech wersjach modelu, każdy osobnik szacował jakość środowiska (w tym sektorze, w którym się znajdował i w 1-2 sektorach sąsiadujących) z pewnym błędem

przynajmniej dla jednego z komponentów dostosowania (różnym dla szacowania tempa wzrostu i dla szacowania ryzyka śmierci). Wersje modelu „z błędem” nie pozwalały na odnalezienie rozmieszczeń optymalnych dla każdego osobnika, ale (tak, jak pierwsza wersja modelu) pozwalała na odnalezienie rozkładów, które wynikają z optymalizacyjnych decyzji każdego osobnika, pomimo tego, że decyzje te były obarczone błędem, ponieważ błędem musiały być obarczone przesłanki, na podstawie, których decyzje te były podejmowane.

O ile potencjalny błąd w szacowaniu stężenia pokarmu (a w konsekwencji tempa wzrostu) i natężenia światła (a w konsekwencji ryzyka śmierci), może wynikać zarówno z niedoskonałości zmysłów (co prowadzi do błędnego szacowania jakości środowiska w miejscu, w którym znajdował się osobnik), jak również z niedoskonałej pamięci (co prowadzi do przeszacowania lub niedoszacowania jakości środowiska na innych głębokościach, na których osobnik przebywał wcześniej) i braku doświadczenia (co prowadzi do przeszacowania lub niedoszacowania jakości środowiska na innych głębokościach, na których osobnik jeszcze nie był), to przyjęte zostało w modelu założenie, że *Daphnia* zawsze dokładnie określa jakość środowiska tam, gdzie się aktualnie znajduje, natomiast może się mylić (i zwykle się myli) przy jego szacowaniu w pozostałych sektorach (tj. potencjalnym źródłem błędu jest druga lub/i trzecia przyczyna, ale nie pierwsza).

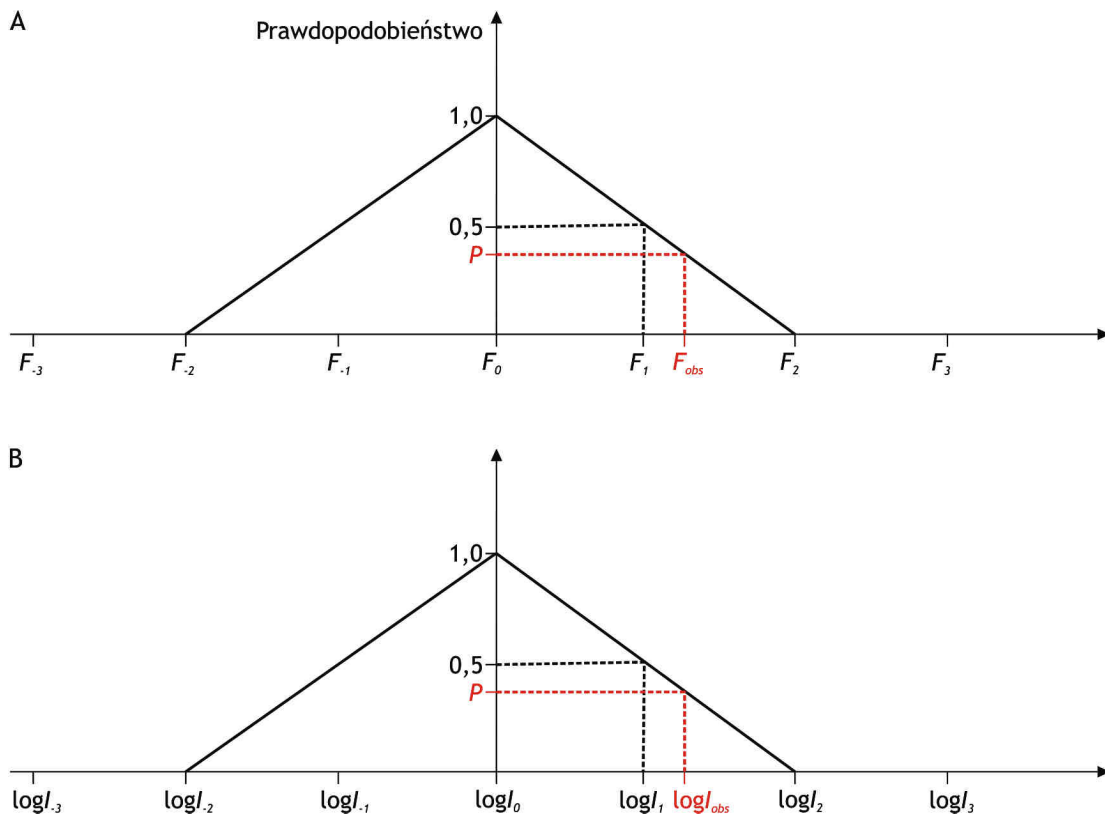
Błąd w szacowaniu tempa wzrostu został wprowadzony do modelu za pomocą wyznaczenia progowej różnicy w stężeniu pokarmu (w porównaniu ze stężeniem w miejscu przebywania), którą *Daphnia* jest w stanie rozróżnić, przy czym, przyjęte zostało założenie, że błąd ten jest różny dla osobników młodych i dojrzałych i, że jeśli osobnik znajduje się w sektorze układu o stężeniu pokarmu  $F_0$ , to istnieje pewne stężenie  $F_1$  (mniejsze od  $F_0$ ) w sąsiadującym sektorze, które zidentyfikuje w 50 % przypadków jako różne od  $F_0$ . Dla wyznaczenia zależności między  $F_0$  i  $F_1$ , został wykorzystany wzór:

$$F_0 - F_1 = a_F \times F_0 \quad (1)$$

gdzie:  $F_0$  to stężenie pokarmu w sektorze we wcześniejszym kroku czasowym,  $F_1$  to stężenie pokarmu w sąsiadującym sektorze w późniejszym kroku czasowym i  $a_F$  to parametr.

Następnie, wprowadzony został dodatkowy parametr  $a_F$  jako odpowiednik prawej strony równania ( $a_F = F_0 - F_1$ ) i przyjęte zostało założenie, że wzór jest symetryczny:

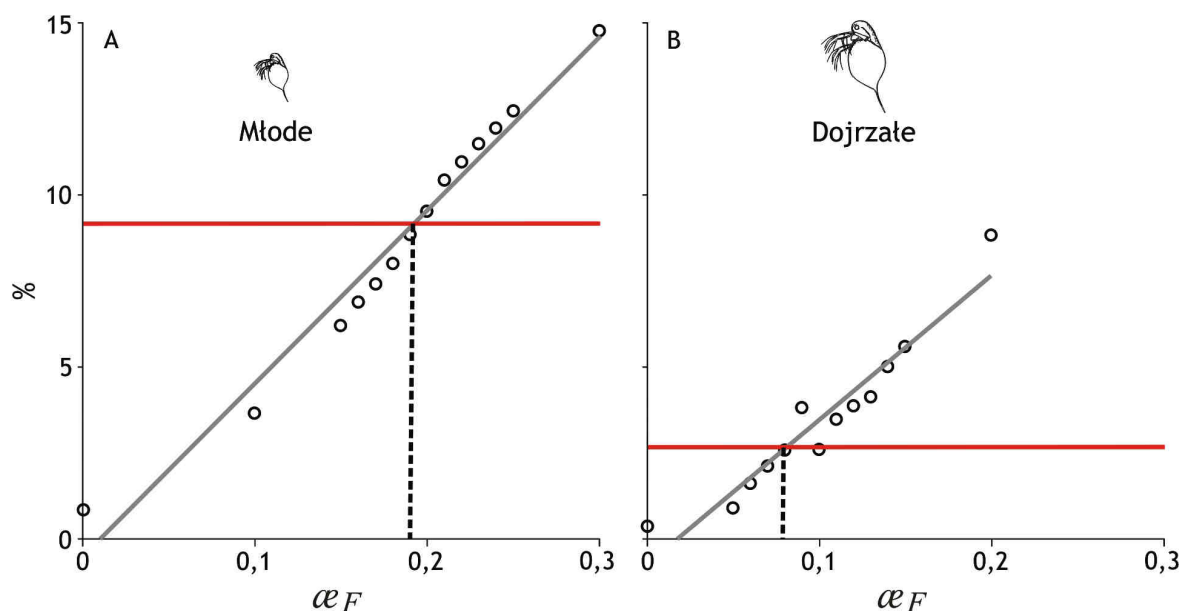
$$a_F = |F_0 - F_1| \quad (2)$$



**Rys. 3.** Rysunek poglądowy wyjaśniający metodę wyznaczania prawdopodobieństwa, że *Daphnia* w następnym kroku czasowym: (A) niedoszacuje wartość  $F_{obs}$ , przyjmując, że wynosi ona  $F_0$ , zamiast ją przeszacować i przyjąć, że wynosi  $F_2$ , przy założeniu, że wirtualna *Daphnia* przebywa w sektorze o stężeniu pokarmu  $F_0$  i szacuje warunki w innym sektorze, w którym rzeczywiste stężenie wynosi  $F_{obs}$ , oraz że odległość między  $F_0$  i  $F_1$  wynosi  $\alpha_F = |F_0 - F_1|$ ; (B) niedoszacuje wartość  $I_{obs}$ , przyjmując, że wynosi ona  $I_0$ , zamiast ją przeszacować i przyjąć, że wynosi  $I_2$ , przy założeniu, że wirtualna *Daphnia* przebywa w sektorze o natężeniu światła pokarmu  $I_0$  i szacuje warunki w innym sektorze, w którym rzeczywiste natężenie wynosi  $I_{obs}$ , oraz że odległość między  $I_0$  i  $I_1$  (w skali logarytmicznej) wynosi  $\alpha_I = |\ln(I_0) - \ln(I_1)|$ .

Metodę szacowania błędu na podstawie tego wzoru przedstawia Rys. 3A. Załóżmy, że wirtualna *Daphnia* znajduje się w sektorze o stężeniu pokarmu  $F_0$ . Stężenia ( $F_1$  i  $F_{-1}$ ), odległe o  $\alpha_F$  od  $F_0$  *Daphnia* rozpoznałaby w 50 % przypadków jako odmienne od  $F_0$ . Jeszcze bardziej różniące się stężenia  $F_2$  i  $F_{-2}$ , *Daphnia* w 50 % przypadków rozpoznałaby jako odmienne od  $F_1$  i  $F_{-1}$  odpowiednio, ale też w 100% rozpoznałaby jako odmienne od  $F_0$ . Dalsze stężenia ( $F_3, F_4, \dots$ ), które *Daphnia* już z pewnością odróżniłaby od  $F_0$ . Załóżmy, że w danym kroku czasowym podczas symulacji, *Daphnia* znajdująca się w komórce ze stężeniem pokarmu  $F_0$ , rozważała płynięcie do innego sektora, w którym jego stężenie wynosiło  $F_{obs}$ . Algorytm liczący błąd odnajdywał najbliższe  $F_{2n}$  (na rysunku  $F_0$ ), które było mniejsze, niż

$F_{obs}$ , i przyjmowane było założenie, że *Daphnia* może oszacować wartość  $F_{obs}$  albo jako  $F_{2n}$ , albo jako  $F_{2n+2}$  (w przykładzie na rysunku albo  $F_0$ , albo  $F_2$ ), następnie wyliczane było prawdopodobieństwo, że *Daphnia* oszacuje  $F_{obs}$  jako  $F_{2n}$ , przyjmując założenie, że prawdopodobieństwo zależy liniowo od wartości  $F_{obs}$  oraz wynosi 1, gdy  $F_{obs} = F_{2n}$  oraz 0, gdy  $F_{obs} = F_{2n+2}$ . Następnie, wylosowywana była liczba losowa i na tej podstawie było określone, czy *Daphnia* oszacowała  $F_{obs}$  jako  $F_{2n}$  ( $F_0$  na Rys. 3A), czy jako  $F_{2n+2}$  ( $F_2$  na Rys. 3A). Wartość  $F_{2n}$ , najbliższa, ale mniejsza od  $F_{obs}$  może być (ze względu na skalę liniową) ujemna. Jeśli więc *Daphnia* oszacowała wartość pokarmu jako ujemną, to podmieniana była ta wartość na 0, co odpowiada sytuacji, w której *Daphnia* uznawała, że w danym sektorze stężenie pokarmu równe jest 0.



**Rys. 4.** Metoda wyznaczania wartości liczbowej dla parametru  $\alpha_F$  (odpowiadającemu różnicy stężeń pokarmu, w 50 % przypadków wykrywanej przez osobnika), dla osobników młodych (A) i dojrzałych (B), na podstawie wyznaczenia punktu przecięcia się krzywej regresji (czarna linia), obrazującej zależność różnicy w tempie wzrostu wirtualnych *Daphnia* przebywającej w wariancie z homogenie i w wariancie z heterogenie rozmieszczonym pokarmem dla różnych wartości błęd ( $\alpha_F$ ) otrzymanych w symulacjach rozmieszczenia *Daphnia* (każdy punkt na wykresie to wynik jednej symulacji) z prostą obrazującą procentową różnicę w tempie wzrostu *Daphnia* w eksperymencie rzeczywistym z homogenie i heterogenie rozmieszczonym pokarmem (czerwona linia).

Wartość liczbową parametru  $\alpha_F$  została wyznaczona na podstawie specjalnie dla tego celu przeprowadzonych eksperymentów we właściwej wersji pionowego układu eksperymentalnego (*Materiał i metody*, II.2.3.4) za pomocą porównania tempa wzrostu (dla każdej z dwóch klas wiekowych osobno) *Daphnia* przebywających w gradiencie pokarmu

(odpowiadającemu uśrednionemu gradientowi w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych) i przebywających w homogenicznie rozmieszczonym pokarmie, gdy jego stężenie odpowiadało najwyższemu stężeniu z górnego sektora w wariancie z gradientem (*Materiał i metody, II.2.4.2*). Wariant z homogenicznie rozmieszczonym pokarmem symulował scenariusz, w którym *Daphnia* dokonywałyby idealnych wyborów, przebywając przez cały czas w miejscu gwarantującym najwyższe tempo wzrostu (z powodu niskiego zagęszczenia, konkurencja była pomijalna). Dla większej przejrzystości w opisie sposobu wyznaczenia wartości parametru, został on przedstawiony na danych liczbowych. Najpierw, na podstawie danych z eksperymentów (*Materiał i metody, II.2.4.2*) została wyliczona różnica w tempie wzrostu między wariantem z homogenicznie i z heterogenicznie rozmieszczonym pokarmem (dla *Daphnia* popełniających i niedopełniających błąd w szacowaniu stężenia pokarmu) tj.:

$$Diff = 100 \% \times (GR_{homo} - GR_{hetero}) \times GR_{homo}^{-1} \quad (3)$$

gdzie,  $GR_{homo}$  – to tempo wzrostu osobników młodych lub dojrzałych w wariancie z homogenicznie rozmieszczonym pokarmem, a  $GR_{hetero}$  to tempo wzrostu osobników w wariancie z pokarmem rozmieszczonym heterogenicznie. Wynik różnicy (9,19 % dla osobników młodych oraz 2,67 % dla dojrzałych) zobrazowany został za pomocą czerwonej linii na Rys. 4. Następnie, dla wyznaczenia wartości  $\alpha_F$ , której odpowiada różnica, przeprowadzone zostały symulacje rozmieszczenia *Daphnia* (młodych lub dojrzałych) w wariancie z homogenicznie i w wariancie z heterogenicznie rozmieszczonym pokarmem dla różnych wartości  $\alpha_F$ . Następnie, tak jak dla danych rzeczywistych, policzono wartości różnicy (wzór 3) między tempem wzrostu wirtualnych osobników w homogenicznym pokarmie, a tempem wzrostu w warunkach heterogenicznych, przy różnych wartościach błędu (Rys. 4, koła). W symulacjach z homogenicznie rozmieszczonym pokarmem w każdym sektorze stężenie pokarmu wynosiło tyle, ile średnie stężenie w tym sektorze w eksperymentach rzeczywistych (*Materiał i metody, II.2.4.2*) w wariancie z homogenicznie rozmieszczonym pokarmem (tj. 0,60 mg C  $\times$  L<sup>-1</sup> dla osobników młodych i 0,59 dla dojrzałych). Każda symulacja trwała 200 kroków czasowych, z tym, że wyniki uwzględnione zostały jedynie z ostatnich 100 kroków, które odzwierciedlały stan, w którym rozmieszczenie *Daphnia* jest już w stanie ostatecznie ukształtowanej równowadze. Każda symulacja została wykonana dla 6 osobników przebywających w kolumnie, tak jak w eksperymentach rzeczywistych (*Materiał i metody, II.2.4.2*). Na podstawie danych wyznaczona została regresja liniowa (czarne linie na Rys. 4), a z punktu przecięcia się regresji

z linią obrazującą różnicę odczytana została wartość parametru  $\alpha_F$ , zarówno dla osobników młodych, jak i dla dojrzałych, odpowiednio 0,19 i 0,08.

Błąd w rozpoznawaniu ryzyka śmierci ze strony drapieżcy został wprowadzony do modelu za pomocą wyznaczenia progowej różnicy w natężeniu światła (dla uproszczenia taką samą dla wszystkich długości fali rozważanych w modelu), którą osobnik (zarówno młody, jak i dojrzały) jest w stanie rozróżnić. W tym celu, najpierw przyjęte zostało założenie, że jeśli osobnik znajduje się w sektorze układu o natężeniu światła  $I_0$ , to istnieje pewne natężenie  $I_1$  (mniejsze od  $I_0$ ) w sąsiadującym sektorze, które zidentyfikuje w 50 % przypadków jako różne (mniejsze) od  $I_0$ . Dla wyznaczenia zależności między  $I_0$  i  $I_1$ , został wykorzystany wzór:

$$I_0 - I_1 = a_I \times I_0 \text{ (Ringelberg i in. 1967)} \quad (4)$$

gdzie:  $I_0$  to natężenie światła w sektorze we wcześniejszym kroku czasowym,  $I_1$  to natężenie światła w sąsiadującym sektorze zakładając na razie, że  $I_0 > I_1$  i  $a_I$  to parametr, dla którego przyjęta została wartość 0,21 (za Ringelbergiem i in. 1967). Wzór następnie został zlogarytmowany:  $\ln(I_0) - \ln(I_1) = \ln(1 \times (1 - a_I)^{-1})$ , wprowadzony został dodatkowy parametr  $\alpha_I$  jako odpowiednik prawej strony równania ( $\alpha_I = \ln(1 \times (1 - a_I)^{-1})$ ) i przyjęte zostało założenie, że wzór jest symetryczny:

$$|\ln(I_0) - \ln(I_1)| = \alpha_I \quad (5)$$

czyli, że  $\alpha$  jest progową różnicą zlogarytmowanych natężeń, zarówno wtedy, gdy  $I_1 > I_0$ , jak również wtedy, gdy  $I_1 < I_0$ . Metodę szacowania błędu na podstawie tego wzoru przedstawia Rys. 3B. Załóżmy, że wirtualna *Daphnia* znajduje się w sektorze o natężeniu światła wynoszącym  $I_0$ . Natężenia  $I_1$  i  $I_{-1}$ , odległe o  $\alpha_I$  od  $I_0$  *Daphnia* rozpoznawałaby w 50 % przypadków jako odmienne od  $I_0$ . Jeszcze bardziej różniące się natężenia  $I_2$  i  $I_{-2}$ , *Daphnia* w 50 % przypadków rozpoznawałaby jako odmienne od  $I_1$  i  $I_{-1}$ , ale też w 100 % rozpoznawałaby jako odmienne od  $I_0$ . W jeszcze bardziej odległych sektorach znajdują się inne natężenia ( $I_{3,4,\dots}$ ), które *Daphnia* już z pewnością odróżniałaby od  $I_0$ . Załóżmy, że w danym kroku czasowym podczas symulacji, *Daphnia* znajdująca się w komórce o natężeniu światła  $I_0$  rozważa płynięcie do innego sektora, w którym natężenie światła wynosi  $I_{obs}$ . Algorytm liczący błąd odnajduje najbliższe  $I_{2n}$  (na rysunku  $I_0$ ), które jest mniejsze, niż  $I_{obs}$ , zostaje przyjęte, że *Daphnia* może oszacować wartość  $I_{obs}$  albo jako  $I_{2n}$ , albo jako  $I_{2n+2}$  (w przykładzie na rysunku albo  $I_0$ , albo  $I_2$ ), następnie wyliczane zostaje prawdopodobieństwo, że *Daphnia* oszacuje  $I_{obs}$

jako  $I_{2n}$ , przyjmując założenie, że prawdopodobieństwo niedoszacowania natężenia zależy liniowo od wartości  $I_{obs}$  oraz wynosi 1, gdy  $I_{obs} = I_{2n}$  oraz 0, gdy  $I_{obs} = I_{2n+2}$ . Następnie, wylosowywana była liczba losowa i na tej podstawie było określane, czy *Daphnia* oszacowała  $I_{obs}$  jako  $I_{2n}$  ( $I_0$  na Rys. 3B), czy jako  $I_{2n+2}$  ( $I_2$  na Rys. 3B).

Zależność tempa wzrostu od stężenia pokarmu glonowego, zagęszczenia *Daphnia*, obecności lub nieobecności informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (symulowanej natężeniem światła i obecnością kairomonów rybich) i wieku *Daphnia* została wprowadzona do modelu za pomocą funkcji nieliniowej typu:

$$Gr = (a_1 \times e^{F_{conc} \times a_2}) + (b \times D_D) + (u \times L_{int} \times A) + f \quad (6)$$

gdzie  $Gr$  – indywidualne tempo wzrostu (dzień<sup>-1</sup>),  $F_{conc}$  – stężenie pokarmu (mg C  $\times$  L<sup>-1</sup>),  $D_D$  - zagęszczenie *Daphnia* (osobn.  $\times$  L<sup>-1</sup>),  $L_{int}$  - natężenie światła ( $\mu$ mol  $\times$  m<sup>-2</sup>  $\times$  s<sup>-1</sup>),  $A$  – wiek *Daphnia* (jako zmienna zerojedynkowa; ang. *dummy variable*, której przyporządkowano wartość 0 dla młodych i wartość 1 dla dojrzałych osobników),  $a_1$ ,  $a_2$ ,  $b$ ,  $u$ ,  $f$  - parametry funkcji (Tabela 2), które zostały wyznaczone na podstawie specjalnie dla tego celu przeprowadzonych eksperymentów (*Materiał i metody*, II.2.4.1). Wyjaśnienie przyczyn wyboru tego wzoru (spośród 262 różnych wariantów) oraz opis parametryzacji tej funkcji opisane zostały w rozdziale *Materiał i metody*, II.2.7.

Ryzyko śmierci *per capita* uwzględnione w modelu było wypadkową ryzyka śmierci wywołanego przez selektywne (względem większych ofiar) drapieżnictwo ryby planktonożerne i nieselektywne (niezależne od natężenia światła, ani zagęszczenia populacji ofiary) ryzyko śmierci wynikające z pozostałych przyczyn:

$$M_t = M_f + M_b \quad (7)$$

gdzie  $M_t$  to całkowite ryzyko śmierci *per capita*,  $M_f$  – ryzyko śmierci *per capita* wywołane przez drapieżnictwo ryby, i  $M_b$  – to ryzyko śmierci *per capita* wynikające z pozostałych przyczyn (ryzyko śmierci „tła”).  $M_b$  wyznaczone zostało dla średniego czasu życia *Daphnia* (jako jego odwrotność)  $M_b = L_t^{-1}$ , gdzie  $L_t^{-1}$  to długość życia *Daphnia*, dla którego przyjęte zostało 50 dni, jako średnia życia dla wioślarek planktonowych w 20°C pochodzących ze środowisk bezrybnych (Cowgill i in. 1985, Pennak 1989).  $M_f$  wyznaczone zostało z tempa konsumpcji *Daphnia* przez pojedynczą rybę pomnożoną przez liczbę ryb i podzieloną przez zagęszczenie *Daphnia* w danym sektorze:



$$M_{f,i} = (C_i \times N_{f,i}) \times N_{D,i}^{-1} = C_i \times D_{f,i} \times D_{D,i}^{-1} \quad (8)$$

gdzie  $M_{f,i}$  to ryzyko śmierci *per capita* wynikające z żerowania ryb planktonożernych w  $i$ -tym sektorze,  $C_i$  – tempo konsumpcji ofiar (osobn.  $\times \text{min}^{-1}$ ),  $N_{f,i}$  – liczba żerujących ryb w  $i$ -tym sektorze,  $N_{D,i}$  = liczba *Daphnia* w  $i$ -tym sektorze,  $D_{f,i}$  - zagęszczenie żerujących ryb w  $i$ -tym sektorze,  $D_{D,i}$  – zagęszczenie *Daphnia* (osobn.  $\times \text{L}^{-1}$ ) w  $i$ -tym sektorze.

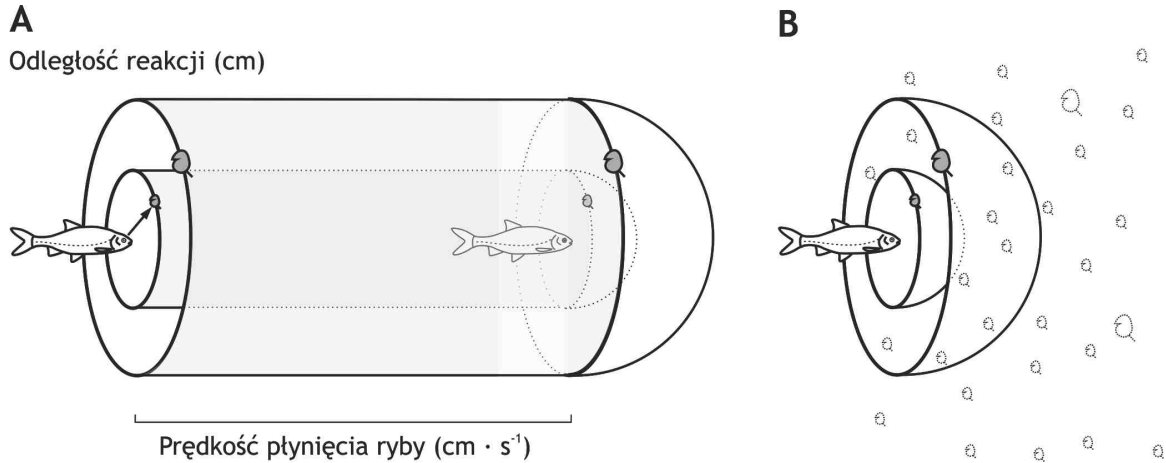
Punktem wyjścia dla stworzenia zależności tempa konsumpcji pojedynczej ryby od wielkości ciała *Daphnia* oraz od zagęszczenia jej populacji było "równanie dysku" (ang. *disk equation*, Holling 1959):

$$C = \frac{1}{\frac{1}{e_r \times D_{D,i}} + T_h} \quad (9)$$

gdzie,  $e_r$  – częstość spotkań ofiar (ang. *encounter rate*),  $D_{D,i}$  – zagęszczenie *Daphnia* w  $i$ -tym sektorze, a  $T_h$  – to czas manipulacji ofiarą, czyli czas potrzebny na schwytanie i zjedzenie ofiary przed atakiem na kolejną, równy najkrótszemu czasowi pomiędzy atakami na kolejne ofiary (Tabela 2), wyznaczonemu w eksperymentach w dużym układzie dla badania zachowań pokarmowych ryb żerujących w grupie (*Materiał i metody, II.2.4.4*). W modelu zostało przyjęte założenie, że czas manipulacji ofiarą nie zależy od jej zagęszczenia i jest taki sam dla obydwu klas wielkości/wiekowych *Daphnia*. Ze względu na to, że ryba płynie podczas żerowania, jej pole widzenia może być przedstawione jako cylinder („rura Eggersa” 1977), którego długość wynika z szybkości poruszania się ryby, a promień jest specyficzną dla ofiary odległością reakcji ( $RD$ ), z jakiej ofiara jest dostrzegana przez rybę, odległością tym mniejszą, im mniejsze są wymiary ciała ofiary (Rys. 5A i 5B). Wtedy częstość spotkań jest liczbą ofiar spotykanych w jednostce czasu w trakcie poruszania się ryby środkiem „rury Eggersa” (Rys. 5A):

$$e_r = V \times \pi \times RD_w^2 \quad (10)$$

gdzie  $V$  to prędkość ryby, niezależna od zagęszczenia ofiary, wyznaczona w specjalnie dla tego celu przeprowadzonych eksperymentach (*Materiał i metody, II.2.4.4*, Tabela 2), a  $RD_w$  to odległość reakcji dla  $w$ -tej klasy wiekowej (2,5- lub 5,5-dniowych osobników).



**Rys. 5.** Pole (objętość) widzenia (ang. *visual field volume*) ryby planktonożernej (A) oraz liczba ofiar w półkuli na około głowy ryby, czyli w objętości  $0,666 \times \pi \times RD^2$  (ang. *apparent density*, B) wg. Gliwicz 2003.

Odległość reakcji zależy od szeregu parametrów wynikających z cech światła, cech zwierzęcia planktonowego i zdolności widzenia ryby, które w tym modelu zostały wyrażone za pomocą zmodyfikowanego wzoru opisanego w pracy Aksnes i Giske (1993). Wzór ten służy dla wyznaczenia zależności odległości reakcji od natężenia światła w jednym z trzech (przyjętych umownie) zakresów spektralnych światła w zakresie widzialnym (360-530, 530-660 lub 660-880 nm) odpowiadającym jednemu z trzech kolorów (niebieskiemu, zielonemu lub czerwonemu):

$$RD = e^d \times L_{int,n}^k \times e^{A \times l} \times e^{E \times \alpha} \quad (11)$$

gdzie,  $RD$  to odległość reakcji,  $L_{int,n}$  – natężenie światła  $n$ -tego zakresu spektralnego (odpowiadającemu jednemu z trzech kolorów),  $E$  – kolor światła w zakresie 660-880 nm (czerwonym, jako zmienna zerojedynkowa, ang. *dummy variable*, której przyporządkowano wartość 0 dla koloru niebieskiego lub zielonego i wartość 1 dla koloru czerwonego),  $A$  to wiek *Daphnia*, również w postaci zmiennej zerojedynkowej (przyjmująca wartość 0 dla młodych i 1 dla dojrzałych),  $d, k, l, \alpha$  to parametry funkcji (Tabela 2), które zostały wyznaczone na podstawie eksperymentów rzeczywistych dla wyznaczenia zależności odległości reakcji ryby planktonożernej od natężenia i składu spektralnego światła (*Materiał i metody, II.2.4.3*). Wyjaśnienie przyczyn wyboru tego wzoru (spośród 262 możliwych wariantów) oraz opis parametryzacji tej funkcji opisane zostały w rozdziale *Materiał i*

metody, II.2.7. Wyznaczenie zależności  $RD$  od natężenia światła będącego mieszkanką wszystkich trzech zakresów pokrywających zakres spektralny światła widzialnego (360-880 nm) przeprowadzone zostało za pomocą wzoru:

$$RD = e^d \times e^{A \times l} \times (e^{E/k \times a} \times L_{int,B} + L_{int,G} + L_{int,R})^k \quad (12)$$

gdzie,  $L_{int,B}$  to natężenie światła niebieskiego,  $L_{int,G}$  to natężenie światła zielonego i  $L_{int,R}$  to natężenie światła czerwonego. Przy uwzględnieniu składu spektralnego zostało przyjęte założenie, że światło o określonym natężeniu w jednym z trzech zakresów spektralnych wpływa tak samo na odległość reakcji ryby zarówno w obecności, jak i w nieobecności pozostałych dwóch zakresów.

"Równanie dysku" jest równoważne z II typem odpowiedzi funkcjonalnej Hollinga (Hollinga 1959) i opisuje scenariusz, w którym wszystkie osobniki w populacji ofiary, znajdujące się w polu widzenia, są chwytane w niskim ich zagęszczeniu. Jednak zgodnie z sugestiami zaprezentowanymi w najnowszej literaturze przedmiotu (Gliwicz i in. 2013), odpowiedź funkcjonalna ryby planktonożernej może być zgodna z trzecim typem, w którym nie wszystkie ofiary są chwytane w niskim ich zagęszczeniu, co wpływałoby na zależny od zagęszczenia zooplanktonu przebieg ryzyka śmierci *per capita*. Wobec tego, "równanie dysku" zostało rozbudowane za Gliwiczem i Wrzosem (2008) do bardziej uniwersalnej funkcji, która w zależności od wartości parametrów do niej wprowadzonych odpowiada II lub III typowi odpowiedzi (wzór 12).

$$C = \frac{w(Y)}{\frac{1}{e_r \times D_{D,i}} + w(Y) \times T_h} \quad (13)$$

gdzie  $w(Y)$  oznacza wykrywalność ofiar na danej głębokości:

$$w(Y) = \frac{Y^n}{\gamma^n + Y^n} \quad (14)$$

gdzie,  $Y$  oznacza zagęszczenie *Daphnia* w polu widzenia ryby (Rys. 5B),  $\gamma$  to progowa wartość zagęszczenia *Daphnia* w polu widzenia, przy którym ryba zaczyna intensywnie żerować (II typowi odpowiedzi funkcjonalnej odpowiada  $\gamma = 0$ , wtedy  $w(Y) = 1$ , i III typowi odpowiada  $\gamma > 0$ ), natomiast wartość parametru  $n$  odpowiada za płynność przejścia od fazy

„nieżerowania” (w niskim zagęszczeniu *Daphnia*), do fazy „żerowania” (w wysokim zagęszczeniu *Daphnia*) – im większa wartość  $n$ , tym gwałtowniejsze jest to przejście. Za pole widzenia ryby przyjęto półkulę o promieniu równym odległości reakcji (Rys. 5B), zatem liczba ofiar w polu widzenia ryby wynosiła:

$$Y = \frac{2}{3} \times \pi \times R D_i^3 \times D_{D,i} \quad (15)$$

Sparametryzowanie przewidywanych wartości tempa konsumpcji dla różnych zagęszczeń zooplanktonu przeprowadzone zostało na podstawie danych ze specjalnie dla tego celu przeprowadzonych eksperymentów z żerującymi w grupie rybami planktonożernymi w układzie z homogennie rozmieszczoną ofiarą (*Materiał i metody, II.2.4.4*). Ze względu na to, że w eksperymentach tych ubywało zooplanktonu w trakcie żerowania (zjedzone ofiary nie były uzupełniane), ubytek ten musiał zostać uwzględniony dla prawidłowego policzenia przewidywanych wartości poprzez wyznaczenie właściwego zagęszczenia i chwilowego tempa konsumpcji dla każdego eksperymentu. Pierwszym etapem uwzględnienia ubytku zooplanktonu dla wyznaczenia rzeczywistego jego zagęszczenia było wyznaczenie wzoru na tempo ubywania ofiar w układzie:

$$\frac{dN_D}{dt} = -N_f \times f(N_D) \quad (16)$$

gdzie,  $N_f$  to liczba ryb w całym układzie,  $f(N_D)$  odpowiedź funkcjonalna, czyli liczba ofiar zjadanych w jednostce czasu przez pojedynczą rybę w zależności od zagęszczenia ofiar, gdyby ofiar nie ubywało (wzór 13, potraktowany jako funkcja liczebności ofiar, przyjmując, że zagęszczenie  $D_D = N_D \times Vol^{-1}$ , gdzie  $Vol$  to objętość układu eksperymentalnego dla badania zachowań pokarmowych ryb żerujących w grupie (Tabela 2, *Materiał i metody, II.2.4.4*, Rys. 12). Drugim etapem było wyznaczenie zależności opisującej liczebności *Daphnia* w czasie poprzez przeprowadzenie całkowania wzoru 16:

$$N_f \times t_z = \frac{-\gamma^n \times (N_{0D,z}^{(-n)} - N_{D,z}^{(-n)})}{(g \times n \times j^n)} + \frac{(\ln(N_{0D,z}) - \ln(N_{D,z}))}{g} + T_h \times (N_{0D,z} - N_{D,z}) \quad (17)$$

gdzie,  $t_z$  to czas trwania z-tego eksperymentu (sesji pokarmowej, 2-15 min),  $N_{0D,z}$  to początkowa liczba *Daphnia* w całym układzie w z-tym eksperymencie, a  $N_{D,z}$  to końcowa ich

liczba (liczba osobników pozostałych po eksperymencie) w całym układzie w z-tym eksperymencie,  $T_h$  to czas manipulacji ofiarą (Tabela 2),  $g$  i  $j$  to zbitki innych parametrów:  $g = \pi \times V \times RD_w^2 \times Vol^{-1}$  oraz  $j = 2 \times \pi \times RD_w^3 \times (3 \times Vol)^{-1}$ , gdzie  $V$  to prędkość pływnięcia ryby (Tabela 2),  $RD_w$  to odległość reakcji względem w-tej klasy wiekowej wyznaczona dla warunków (natężenia i składu spektralnego światła, *Materiał i metody*, II.2.3.4, Rys. 10), i  $Vol$  to objętość układu eksperymentalnego (Tabela 2, *Materiał i metody*, II.2.4.4, Rys. 12).

Przy założeniu II typu odpowiedzi, wzór 13 upraszcza się (do wzoru 9) ze względu na to, że  $w(Y) = 1$ . Wobec tego we wzorze tym znane były wszystkie wartości parametrów i mogły zostać policzone przewidywane wartości.

Kolejnym etapem było wyznaczenie tempa konsumpcji w zależności od zagęszczenia zooplanktonu dla funkcji zgodnej z przebiegiem III typu. przewidywanych wartości tempa konsumpcji w zależności od zagęszczenia zooplanktonu poprzez dopasowanie parametrów  $\gamma$  i  $n$  dla funkcji zgodnej z przebiegiem III typu. Dla dopasowania do danych eksperymentalnych wartości parametrów  $\gamma$  i  $n$ , została wykorzystana nieliniowa metoda najmniejszych kwadratów (*Nonlinear least squares*), przy czym zmienną zależną była liczba *Daphnia* pod koniec sesji żerowania ( $N_{D,z}$ ), natomiast zmiennymi niezależnymi były czas żerowania ( $t_z$ ) i początkowa liczba *Daphnia* ( $N_{0D,z}$ ). Wzór 17, określający zależność  $N_{D,z}$  od  $t_z$  i  $N_{0D,z}$ , jest trudny do arytmetycznego przekształcenia do postaci umożliwiającej bezpośrednie policzenie  $N_{D,z}$  (typu  $N_{D,z} = F(t_z, N_{0D,z})$ ), wobec tego w modelu statystycznym przewidywane wartości  $N_{D,z}$  były każdorazowo liczone w sposób numeryczny (korzystając z równania 17), za pomocą metody Newtona. Tak dopasowany został wzór funkcji dla scenariusza, w którym ryba żeruje na młodej ofierze, ponieważ eksperymenty dla parametryzacji przeprowadzone zostały jedynie na młodej ofierze (6-dniowej *Artemia salina*, której masa odpowiada młodej *Daphnia longispina*). Dla scenariusza, w którym ryba żeruje na dojrzałej ofierze, przyjęta została ta sama wartość parametru  $n$ , ale wartość parametru  $\gamma$  (wyznaczonego dla ryby żerującej na młodych osobnikach) została podzielona przez 100, ponieważ zgodnie z literaturą przedmiotu (Gliwicz i Wrzosek 2008), progowa wartość zagęszczenia, przy której ryba zaczyna żerować na młodej i dojrzałej ofierze, może różnić się od siebie nawet o dwa rzędy wielkości.

**Tabela 2.** Zbiorcza tabela parametrów wykorzystanych w modelu wraz z informacją o źródle danych, na podstawie których ich wartości zostały wyznaczone

Parametr	Opis	Wartość	Jednostka	Źródło
$\alpha_{F,juv}$	Współczynnik dla młodych we wzorze 2	0,19	$mg\ C \times L^{-1}$	Własne: Materiał i metody, II.2.4.2
$\alpha_{F,ad}$	Współczynnik dla dojrzałych we wzorze 2	0,08	-	Materiał i metody, II.2.4.2
$a_I$	Współczynnik we wzorze 4	0,21	-	Ringelberg i in. 1967
$a_1$	Współczynnik 1 tempa wzrostu <i>Daphnia</i> od stężenia pokarmu we wzorze 6	-0,2375	$dzień^{-1}$	Materiał i metody, II.2.4.1
$a_2$	Współczynnik 2 tempa wzrostu <i>Daphnia</i> od stężenia pokarmu we wzorze 6	-3,5080	$L \times mg\ C^{-1}$	Materiał i metody, II.2.4.1
$b$	Współczynnik tempa wzrostu <i>Daphnia</i> od zagęszcz. popul. we wzorze 6	-0,00003	$L \times osobn.^{-1} \times dzień^{-1}$	Materiał i metody, II.2.4.1
$u$	Współczynnik tempa wzrostu <i>Daphnia</i> od interakcji między natężeniem światła i wiekiem we wzorze 6	-0,0249	$m^2 \times s^{-1} \times dzień^{-1} \times \mu mol^{-1}$	Materiał i metody, II.2.4.1
$f$	Wyraz wolny we wzorze 6	0,2142	$dzień^{-1}$	Materiał i metody, II.2.4.1
$M_b$	Śmiertelność tła (wzór 7)	$9,65 \times 10^{-8}$	$s^{-1}$	Cowgill i in. 1985
$D_f$	Zagęszczenie ryb w jeziorze (wzór 8)	2,00	$osobn. \times m^{-3}$	Gliwicz i in. 2006b
$V$	Prędkość ryby podczas żerowania (wzór 10)	5,62	$cm \times s^{-1}$	Materiał i metody, II.2.4.4
$d$	Wyraz wolny we wzorze 11	-3,0789	-	Materiał i metody, II.2.4.3
$k$	Współczynnik $RD$ od natężenia światła we wzorze 11	0,7052	-	Materiał i metody, II.2.4.3
$l$	Współczynnik $RD$ od wieku <i>Daphnia</i> we wzorze 11	0,2183	-	Materiał i metody, II.2.4.3
$\alpha$	Współczynnik $RD$ od zmiennej $E$ we wzorze 11	-0,3999	-	Materiał i metody, II.2.4.3
$T_h$	Czas manipulacji ofiarą (wzór 13)	0,98	s	Materiał i metody, II.2.4.4
$\gamma_{juv}$	Progowa liczba młodych <i>Daphnia</i> w polu widzenia ryby inicjująca żerowanie w układzie homogenym (wzór 14)	3,420	osobnik	Materiał i metody, II.2.4.4
$\gamma_{ad}$	Progowa liczba dojrzałych <i>Daphnia</i> w polu widzenia ryby inicjująca żerowanie w układzie homogenym (wzór 14)	0,034	osobnik	Gliwicz i in. 2013
$n$	Ostrość funkcji opisująca przejście ryby z fazy nieżerowania do fazy żerowania w ukł. homogenym (wzór 14)	0,847	-	Materiał i metody, II.2.4.4
$Vol$	Objętość ukł. dla badania zachowań pokarmowych dużej grupy ryb	2000	L	Materiał i metody, II.2.4.4

### **II.2.3. Układy eksperymentalne dla zbadania rozmieszczenia zwierząt planktonowych w gradiencie pokarmu i w gradiencie niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy**

#### **II.2.3.1. Wprowadzenie**

O ile większość układów eksperymentalnych wykorzystanych do przeprowadzenia eksperymentów dla parametryzacji modelu konstruowanego w ramach rozprawy wchodzi w skład standardowego wyposażenia Zakładu Hydrobiologii UW (1. „komory Lamperta”, 2. układ eksperymentalny złożony z dwóch identycznych systemów podzielonych na 10 połączonych ze sobą zbiorników dla badania przemieszczania się ryb w relatywnie dużej skali, Gliwicz i Maszczyk, w przygotowaniu, oraz 3. układ eksperymentalny pozwalający na precyzyjne badanie zachowań pokarmowych ryb planktonożernych żerujących w stałym zagęszczeniu planktonowych ofiar, Bartosiewicz i Gliwicz 2011), o tyle główny układ eksperymentalny, niezbędny dla zbadania rozmieszczenia zwierząt planktonowych w gradiencie pokarmu i w gradiencie niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy, wykorzystany w niektórych eksperymentach dla parametryzacji modelu (eksperymenty dla wyznaczenia efektu niedoskonałej zdolności szacowania stężenia pokarmu w gradiencie) i przede wszystkim w eksperymentach dla weryfikacji przewidywań modelowych (*Materiał i metody*, II.2.6), został skonstruowany specjalnie dla celów realizacji projektu rozprawy. Choć pierwsze próby skonstruowania takiego układu rozpoczęte zostały jeszcze na początku 2009 roku, to dopiero trzecia, kolejno udoskonalana, wersja układu eksperymentalnego, ukończona w grudniu 2013 (złożona z dwóch identycznych pionowych kolumn), spełniła każdy z sześciu warunków (wymienionych we wstępie rozprawy) niezbędnych dla weryfikacji hipotez rozprawy. Układ ten daje możliwość szerokiego zastosowania w zakresie badań dotyczących pionowego rozmieszczenia zooplanktonu w różnych gradientach biotycznych (gradienty glonów planktonowych, sinic, informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy) i abiotycznych (gradienty zasolenia, stężenia tlenu, temperatury) czynników w jeziorach i w oceanach (Maszczyk 2016, Załącznik 3).

Każdy z trzech wersji układu zlokalizowany był w laboratorium-ciemni z precyzyjną regulacją temperatury powietrza i wody. W każdej z tych wersji, zarówno gradient pokarmu, jak i gradient informacji o niebezpieczeństwie tworzony był w podobny sposób. Gradient pokarmu tworzony był za pomocą kierunkowego przepływu medium zawierającego różne stężenie pokarmu (glonów *Acutodesmus obliquus* w pierwszym i trzecim oraz *Chlamydomonas reinhardtii* w drugim układzie) docierające do różnych sektorów każdego z nich i odpływu umieszczonego w jednym z końców układu. Gradient informacji o

niebezpieczeństwie symulowany był natomiast za pomocą dwóch współdziałających ze sobą komponentów: (1) równomiernie rozmieszczonych kairomonów rybich i (2) gradientu światła (jego natężenia, a w ostatnim układzie dodatkowo również jego spektrum).

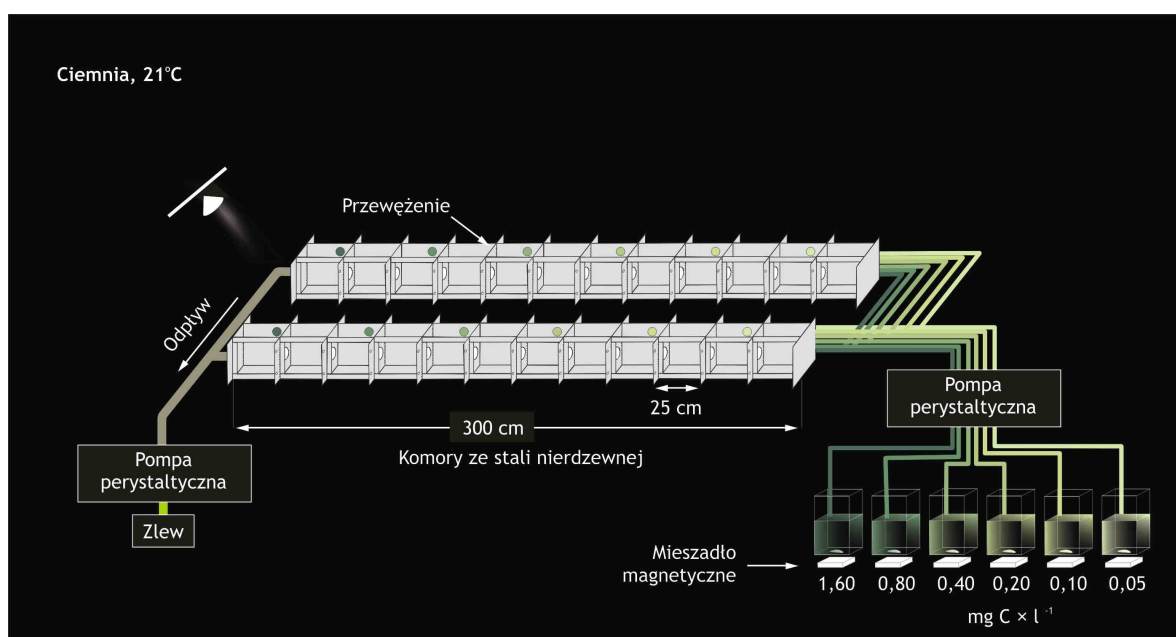
### II.2.3.2. Pierwsza wersja układu eksperymentalnego

Pierwszy układ został skonstruowany w poziomie, czyli został zastosowany przy jego konstruowaniu kontrowersyjny zabieg „położenia słupa wody na boku” dla stworzenia stabilnego gradientu pokarmu po przyjęciu założenia, że zwierzęta planktonowe rozmieszczają się będą w podobny sposób w poziomie, jak w pionie, w odpowiedzi na zastosowane gradienty. Układ ten złożony był z dwóch 3-metrowych szeregów złożonych z 12 sektorów ( $L = 12 \times 25$  cm,  $H = 20$  i  $W = 15$  cm,  $V = 90$  L) zbudowanych ze stali nierdzewnej, łączonych ze sobą uszczelką i skręcanych śrubami. Gradient pokarmu tworzony był poprzez zastosowanie kierunkowego przepływu medium powstałego w wyniku wprowadzania świeżego medium (dozowanego z 10 L akwariów mieszanych mieszadłami magnetycznymi) z różnym stężeniem *Acutodesmus* (mieszanego z wodą jeziorną filtrowaną przez filtry o wielkości porów  $0,2 \mu\text{m}$ ) do co drugiego sektora każdego z dwóch szeregów (kolumn) oraz odprowadzania zużytego medium w sektorze z najwyższym stężeniem pokarmu (Rys. 6). W każdym eksperymencie tworzono gradient pokarmu za pomocą wstępnego dodania określonego stężenia pokarmu do każdego sektora. Gradient ten utrzymywano za pomocą ustalenia stałego przepływu medium pokarmowego, dozowanego za pomocą pompy perystaltycznej. Gradient pokarmu wyznaczany był po godzinie od jego ustalenia się oraz pod koniec każdego eksperymentu poprzez pobranie pipetą prób medium z każdego sektora i zmierzenie stężenia chlorofilu za pomocą fluorometru (*TD-700*), a następnie przeliczeniu za pomocą krzywej kalibracyjnej zawartości chlorofilu na zawartość węgla organicznego wyznaczanego spektrofotometrycznie. Gradient światła wytwarzany był przez ukośnie padający strumień światła halogenowego, którego strumień wpadał do sektora z najwyższym stężeniem pokarmu i docierał do kolejnych sektorów jedynie przez przewężenia między mini, ponieważ wszystkie pozostałe sektory były osłonięte wokół szczelnymi kurtynami z czarnego materiału.

Ze względu na brak możliwości obserwowania zwierząt podczas eksperymentu, możliwe było otrzymywanie tylko jednego wyniku rozmieszczenia *Daphnia* w każdym eksperymencie (pod koniec każdego z nich). Pierwsza wersja układu nie spełniała dwóch z sześciu warunków wymienionych we wstępie niezbędnych dla weryfikacji hipotezy. Po pierwsze, gradient światła mógł nie nieść ze sobą wiarygodnej informacji o niebezpieczeństwie ze strony



drapieżcy (niespełniony warunek 5), ponieważ gradient światła zmieniał się w nienaturalnym tempie (skokowo, w cyklu 16 D : 8 N), a wejściowe źródło światła nie odzwierciedlało składu spektralnego światła słonecznego, i (tym bardziej) skład spektralny w poszczególnych sektorach nie odzwierciedlał składu spektralnego na głębokościach odpowiadających mu w słupie wody jeziornej. Po drugie, układ nie umożliwiał swobodnego przemieszczania się zwierzętom eksperymentalnym (niespełniony warunek 2), ponieważ zwierzęta planktonowe nie są mobilne w poziomie i kilka dni było potrzebne do ustalenia się równowagi dynamicznej w ich rozmieszczeniu.



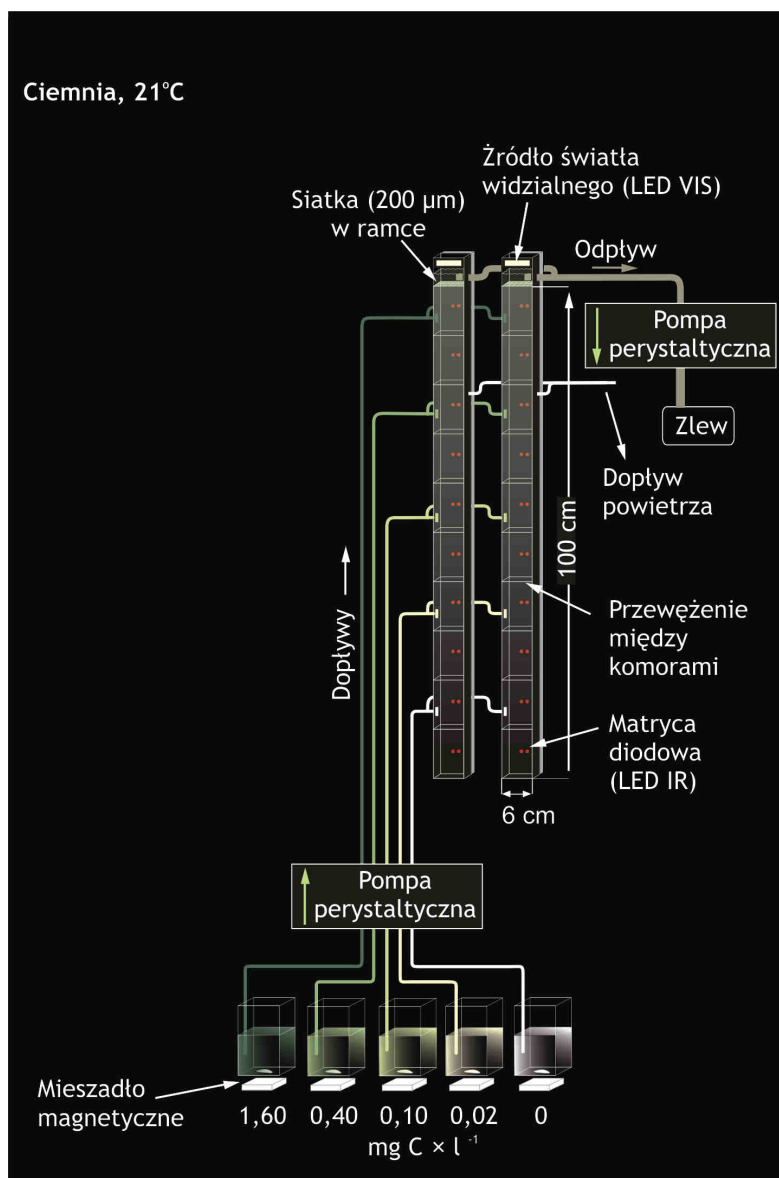
**Rys. 6.** Schemat pierwszej wersji układu eksperymentalnego („położonego słupa wody na boku”) dla badania rozmieszczenia zooplanktonu w gradiencie pokarmu i w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy: wymiary układu oraz elementy konstrukcyjne niezbędne dla stworzenia gradientu pokarmu i gradientu natężenia światła jako jednego z komponentów gradientu informacji o niebezpieczeństwie.

### II.2.3.3. Druga wersja układu eksperymentalnego

Układ składał się z dwóch pionowych kolumn (wysokości 105 cm, w tym 100 cm wysokości słupa wody, długości 6 cm i szerokości 6 cm, o objętości 3,6 L), zbudowanych z pleksi (boczne ściany z czarnej, przednia i tylna ściana z przezroczystej), w których udało się stworzyć stabilny i taki sam w obydwu kolumnach (i powtarzalny w kolejnych eksperymentach) gradient pokarmu, za pomocą: (1) kierunkowego przepływu od dołu ku górze, tworzonego przez dopływy świeżego medium z różnym stężeniem pokarmu w każdym

sektorze oraz przez odpływ medium zlokalizowany powyżej górnego sektora, (2) zastosowania drobnych glonów ze zdolnością aktywnego unoszenia się w toni wodnej (zielenice *Chlamydomonas reinhardtii*), (3) przewężeń między każdym z 10 sektorów układu oraz (4) dopływu pęcherzyków powietrza (jednego na 0,5 min, wprowadzanego za pomocą pompy perystaltycznej) zlokalizowanego w trzecim sektorze układu, który nadawał cyrkulację medium w czterech górnych sektorach każdej kolumny (Rys. 7). Gradient pokarmu wyznaczany był za pomocą pomiaru zawartości glonów w próbach z każdego sektora pobieranych za pomocą strzykawki zakończonej cienkim wężykiem z obciążeniem, zanurzanych od góry kolumny. Gradient światła w tym układzie wytwarzany był za pomocą białego źródła światła LED-owego (emitującego znikomą ilość ciepła, czyli światła w zakresie średniego IR, Rys. 1B), z którego promienie padały ukośnie bezpośrednio tylko do górnego sektora każdej z kolumn, a światło rozproszone przechodziło do niższych sektorów przez przewężenia między sektorami zmniejszającymi ilość odbitego światła od ścianek kolumny. Sterownik światła (*V30 LED PWM 12k*), podłączony do diod emitujących światło widzialne, pozwalał na automatyczną zmianę natężenia światła w cyklu dobowym (12 skoków od najniższego do najwyższego natężenia światła – w pierwszym sektorze odpowiednio  $0,0$  i  $4,8 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ). Matryca z diodami LED na podczerwień, zlokalizowana z tyłu każdej komory, umożliwia obserwowanie i wielokrotną w ciągu doby rejestrację przemieszczania i rozmieszczenia zwierząt na każdej głębokości w całkowitej ciemności za pomocą noktowizora. Obydwa gradienty wyskalowane zostały względem gradientów w typowym jeziorze jak 1:10 (czyli 1 metr układu symuluje warunki w 10m słupa wody w jeziorze). Szybkie ustalenie się równowagi w rozmieszczeniu zwierząt umożliwiało przeprowadzenie krótkotrwałych (dobowych) eksperymentów. Zarówno w dzień, jak i w nocy zwierzęta zliczane były w każdym sektorze kilkunastokrotnie w trakcie każdego dobowego eksperymentu. Druga wersja układu nie spełniała dwóch z sześciu warunków wymienionych we wstępie niezbędnych dla weryfikacji hipotezy. Po pierwsze, podobnie jak w pierwszej wersji układu, gradient światła mógł nie nieść ze sobą wiarygodnej informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (niespełniony warunek 5), ponieważ źródło światła LED-owego nie pozwalało na odzwierciedlenie gradientu spektrum zgodnie z gradientem spektrum w jeziorze. Natomiast, pomimo tego, że został zainstalowany sterownik, umożliwiający gradacyjną zmianę natężenia światła, to zmiany natężenia nadal były nienaturalnie skokowe, co również mogło wpływać na wybór głębokości przez *Daphnia*. Po drugie, pęcherzyki powietrza, dozowane dla ustabilizowania gradientu pokarmu poprzez stworzenia obiegu medium w górnych sektorach, tworzyły sztuczne warunki, które wpływały

na wybór głębokości przez *Daphnia*, co nie było uwzględnione w układzie wirtualnym (niespełniony warunek 6).

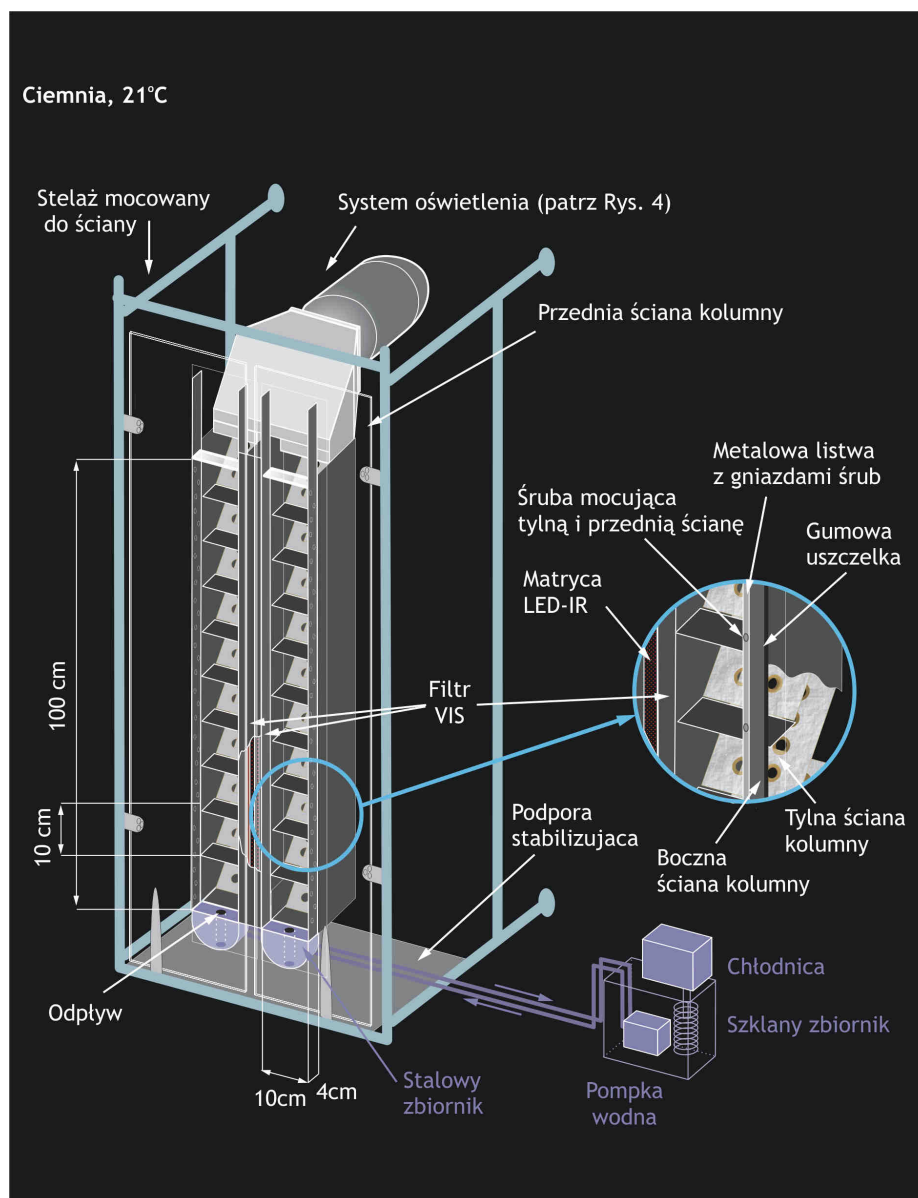


**Rys. 7.** Schemat drugiej wersji układu eksperymentalnego (wstępnego pionowego) dla badania rozmieszczenia zooplanktonu w gradiencie pokarmu i w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy: wymiary układu oraz elementy konstrukcyjne niezbędne dla stworzenia gradientu pokarmu i gradientu natężenia światła jako jednego z komponentów gradientu informacji o niebezpieczeństwie.

#### II.2.3.4. Trzecia (właściwa) wersja układu eksperymentalnego

Trzecia wersja układu była konstrukcyjnie podobna do wersji drugiej. Wprowadzone zostało jednak wiele udoskonaleń, które można zgrupować w osiem zestawów cech, które zwiększały

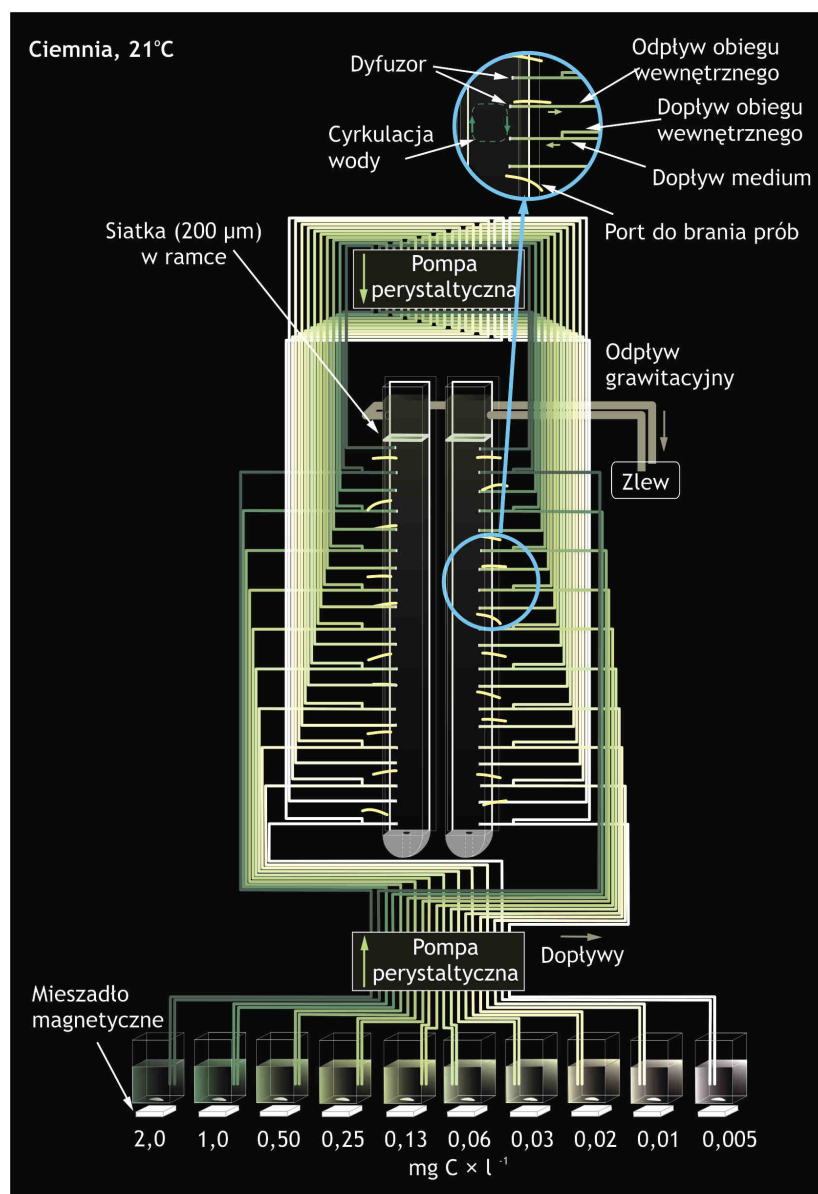
komfort prowadzenia w nim eksperymentów, umożliwiały jeszcze lepsze odzwierciedlenie warunków panujących w słupie wody pelagialu typowego jeziora eutroficznego oraz powodowały, że spełniony wreszcie został każdy z sześciu wymienionych we wstępie warunków niezbędnych dla weryfikacji hipotezy w gradiencie pokarmu oraz w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony ryby planktonożerne (Maszczyk 2016, Załącznik 3). **Po pierwsze**, komory układu były złożone z 2 części, (tylnej i przedniej), połączonych ze sobą uszczelką oraz skręcanych śrubami tak, aby łatwo można było je czyścić i modyfikować wewnętrzną część każdej z nich (Rys. 8). **Po drugie**, uległ zmianie kształt komór (zostały podwyższone do 120 cm (w tym 100 cm wysokości słupa wody) oraz poszerzone w jednym kierunku od strony obserwatora do długości 12,5 cm i zwężone (spłaszczone) do szerokości 4,0 cm, co dało objętość  $V = 5$  L. Przednia ściana każdej z nich została zrobiona ze szkła kwarcowego odpornego na zarysowania i bardziej przezroczystego, niż tradycyjne szkło sodowe, co umożliwiało monitorowanie zwierząt w podczerwieni w każdym sektorze za pomocą kamery lub obserwowanie i liczenie osobników za pomocą noktowizora. Matryca diodowa z 200 diodami *IR* (*COM-09469*), świecącymi w zakresie 840-860 nm, więc emitującymi światło niewidoczne dla *Daphnia* (Storz i Paul 1998) i nie dającymi ciepła, zlokalizowana została z boku (pomiędzy obiema ustawionymi obok siebie kolumnami), dzięki czemu promienie świetlne oświetlają bocznie wnętrze każdego sektora, co pozwalało lepiej widzieć zwierzęta, niż w układzie poprzednim, ponieważ światło z matrycy nie oślepiało obserwatora, a zwierzęta były widoczne jako białe punkty na czarnym tle. Wzdłuż wewnętrznej ściany każdej z kolumn, zbudowanej z przezroczystej pleksi ( $W = 6$  mm), naklejony został foliowy filtr (*LEE Filters, Brown 746*), który jest transparentny dla promieniowania *IR*, dzięki czemu silne światło z diod *IR* (ustawionych tak, że w każdej parze diod jedna świeciła w stronę jednej kolumny, a druga w stronę drugiej) dostawało się do wnętrza kolumn, natomiast światło widzialne zatrzymywane było wewnątrz kolumny (Rys. 8). Tylne ściany każdej z kolumn zbudowane zostały z transparentnej pleksi (grubość 6 mm), natomiast ściana zewnętrzna z nieprzezroczystej czarnej pleksi (grubość 6 mm). Kolumny były umocowane do ściany za pomocą stalowego stelaża, co stabilizowało układ i minimalizowało drgania, które mogłyby wpłynąć na zachowanie *Daphnia*.



**Rys. 8.** Schemat finalnej wersji trzeciego układu (dwóch pionowych kolumn) dla badania rozmieszczenia zooplanktonu w gradiencie pokarmu i w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (wg. Maszczyka 2016): wymiary układu, elementy stabilizujące układ, połączenie między przednią i tylną częścią kolumny, lokalizacja matrycy LED-IR i filtra nieprzepuszczającego światło w zakresie widzialnym (Filtr VIS, *Brown 746*, *LEE Filters*), jak również elementy układu odpowiedzialne za tworzenie stabilnego i powtarzalnego w kolejnych eksperymentach typowego dla stratyfikacji letniej gradientu termicznego (oznaczone kolorem fioletowym).

**Po trzecie**, dozowanie pęcherzyka powietrza wywołującego cyrkulację w górnych sektorach każdej niezbędna dla stabilizacji gradientu pokarmu (co nie pozostawało bez wpływu na decyzje o wyborze głębokości podejmowane przez *Daphnia*), zostało zastąpione przez mały obieg wody wprowadzony w każdym sektorze kolumny. Cyrkulacja medium w

małym obiegu tworzona była poprzez odprowadzanie z wnętrza każdego sektora medium za pomocą wężyka zakończonego okrągłym i płaskim (średnica 20 mm,  $W = 2$  mm) dyfuzorem, przylegającym do bocznej ściany kolumny, rozpraszającym medium wypływające z sektora (aby zmniejszyć ciśnienie wypływającego medium na tyle, by nie wpływało na ruch *Daphnia*) oraz poprzez doprowadzanie tego samego medium do sektora, również wężykiem zakończonym takim samym dozownikiem rozpraszającym medium (aby zminimalizować tworzenie się mikrogradientów wewnątrz sektora). Jednak, zanim medium ponownie powracało do sektora, łączyło się (mieszało) ze świeżym medium (w stosunku 2 : 1, starego medium do świeżego, Rys. 9). Każdy z dwóch obiegów napędzany był oddzielną pompą perystaltyczną tak, że świeże medium w głównym obiegu dozowane było w tempie  $180 \text{ ml} \times \text{h}^{-1}$ , a medium w małym obiegu przepływało w tempie  $90 \text{ ml} \times \text{h}^{-1}$ . Wobec tego sumaryczne tempo dopływającego medium do każdego sektora z połączonych dopływów z obydwu obiegów wynosiło  $270 \text{ ml} \times \text{h}^{-1}$ . Wielkość przepływu w każdej z pomp ustalona została we wstępnych testach poprzedzających przeprowadzenie eksperymentów właściwych dla weryfikacji prognoz modelowych w tym układzie tak, aby było na tyle słabe, by nie wpływać istotnie na decyzje *Daphnia* o wyborze głębokości, a z drugiej strony było na tyle silne, by stabilizować tak gradient glonowy, aby zamiast drobnych glonów *Chlamydomonas*, trudniejszych w hodowli, mogły zostać zastosowane ponownie glony *Acutodesmus* (tak, jak w eksperymentach w pierwszym układzie poziomych kolumn dla weryfikacji prognoz modelowych). Stworzony gradient pokarmu odpowiadał przebiegowi gradientu w j. Roś (wrzesień 2012), przy założeniu, że długość 1 sektora (10 cm) odpowiadała głębokości 1,5 metra (skala 1:15). **Po czwarte**, po środku każdego sektora, jak również na górze górnego i na dole dolnego sektora w każdej z kolumn, zainstalowany został port (kran) do pobierania prób (Rys. 9), który umożliwiał sprawne pobieranie prób wody dla wyznaczenia gradientu pokarmu.



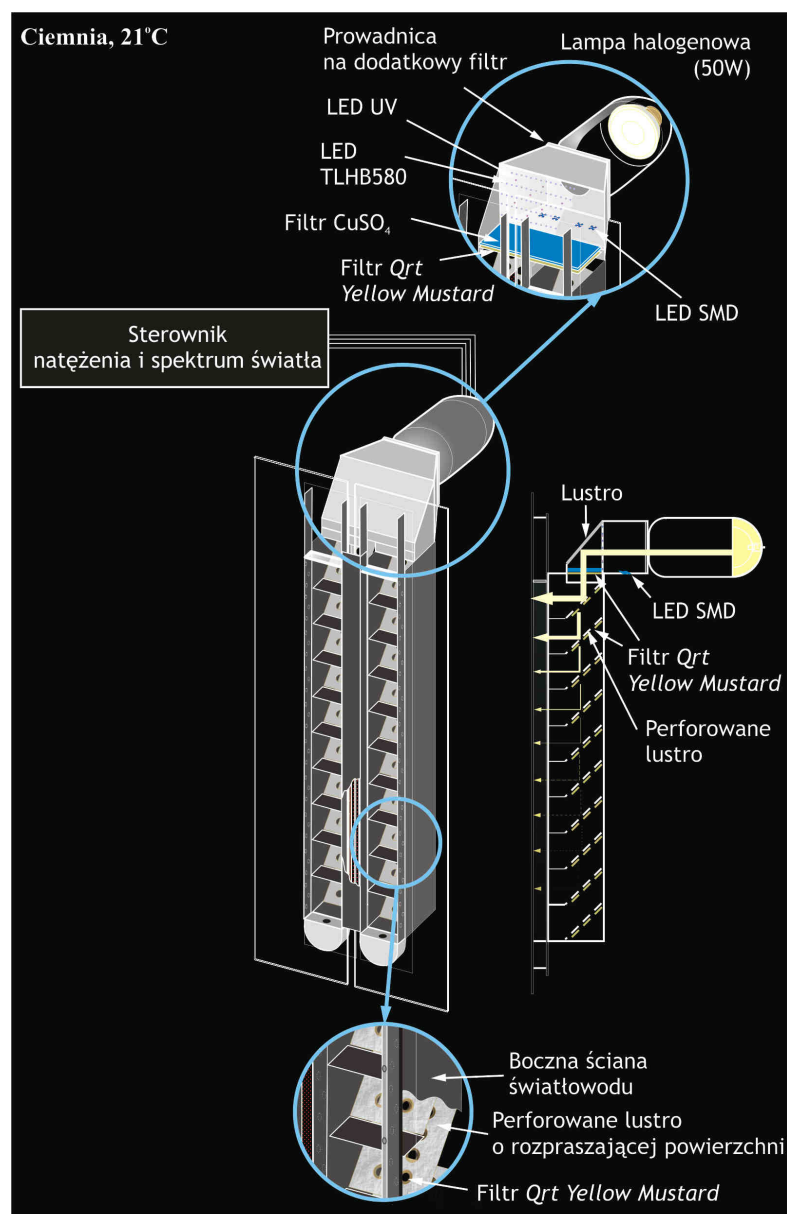
**Rys. 9.** Schemat elementów konstrukcyjnych finalnej wersji układu (dwóch pionowych kolumn) odpowiedzialnych za tworzenie niezależnego od obecności innych gradientów, stabilnego, powtarzalnego i typowego dla większości jezior gradientu pokarmu glonowego (z maksimum stężenia w warstwach przypowierzchniowych) wg. Maszczyka (2016). Gradient tworzony jest przy pomocy dwóch przepływów medium: obiegu dużego, od dolnych sektorów do górnych, tworzonego przez dopływy filtrowanej wody z różnym stężeniem glonów (jeden dopływ w każdym sektorze) i odpływu grawitacyjnego powyżej górnego sektora, jak również obiegu małego, wewnątrz każdego sektora obydwu kolumn, tworzonego za pomocą jednego odpływu i jednego dopływu. Każdy z dwóch obiegu napędzany jest oddzielną pompą perystaltyczną.

**Po piąte,** światło do każdego sektora padało bocznie, dzięki czemu gradient natężenia światła był ostrzejszy, niż w poprzednich układach i lepiej odzwierciedlał zmiany natężenia w słupie wody jeziornej (Rys. 22). Gradient natężenia światła tworzony był za pomocą różnych źródeł światła oraz systemu światłowodów (przewodzących wiązkę świetlną) i luster

(zmieniających kierunek padania wiązki świetlnej, Rys. 10). Główne źródło światła (50 W lampa halogenowa) znajdowało się w zorientowanym poziomo, nieprzepuszczalnym dla światła, stalowym pojemniku, który był połączony z drugim stalowym pojemnikiem, zawierającym dwa dodatkowe źródła światła LED-owego (66 diod *TLHB580* oraz 4 diod *SMD Helixeon star Royal Blue*), system filtrów optycznych oraz szklane lustro nachylone pod kątem  $45^\circ$ . Wiązka światła z jednego lub wielu źródeł (w zależności od tego, jakie natężenie i spektrum ma docierać do kolumn) odbijało się od lustra i pionowo wpadało do pojedynczego światłowodu, który rozdzielał się symetrycznie na kolejne dwa światłowody, które zlokalizowane zostały z tyłu wzdłuż każdej z kolumn. W każdej części każdego światłowodu, odpowiadającej jednemu sektorowi układu, znajdowało się ukośnie ustawione (pod kątem  $45^\circ$ ) perforowane lustro (poprzez równomiernie wycięte otwory), zbudowane z porowatej folii aluminiowej, od którego część wiązki się odbijała, a część przechodziła do kolejnego segmentu światłowodu, odpowiadającemu kolejnemu sektorowi. Perforacja w każdym lustrze była identyczna, i została tak dobrana, aby finalne światło przechodzące do każdego kolejnego lustra odbijało się od niego i dawało wewnątrz każdego sektora natężenie światła odpowiadające natężeniu z wybranego scenariusza z jeziora Roś, przy założeniu, że długość 1 sektora (10 cm) odpowiada głębokości 1,5 metra (skala 1:15). Natężenie światła na każdej głębokości zostało dobrane za pomocą prób i błędów przy użyciu podwodnego światłomierza (*LI-COR 189*). Specyfika konstrukcji światłowodów prowadziła do tego, by gradient natężenia światła w każdej z kolumn był dyskretny z ostrymi zmianami natężenia na granicach między sektorami. Zbiorniki ze źródłami światła zostały zorientowane w pozycji horyzontalnej ze względu na ograniczenia wysokości pomieszczenia laboratoryjnego. **Po** **szóste**, został odtworzony w skali nie tylko gradient natężenia, ale również gradient spektrum światła (Rys. 22). Gradient spektrum stworzony został za pomocą ukształtowania spektrum wejściowej wiązki światła, która docierała do pierwszego sektora oraz za pomocą zmian składu spektralnego w poszczególnych częściach każdego z dwóch światłowodów, odpowiadających poszczególnym sektorom każdej z kolumn (Maszczyk 2016, Załącznik 3). Choć system oświetlenia w układzie pozwalał na stworzenie dowolnego inicjalnego spektrum w zakresie między 400 i 780 nm za pomocą regulacji natężenia światła każdego z trzech źródeł oraz poprzez wykorzystanie różnej kombinacji foliowych filtrów (wprowadzanych w jedną z trzech prowadnic na drodze przebiegu wiązki świetlnej przez drugi stalowy pojemnik), dobranych z obszernej palety kolorów oferowanej między innymi przez firmę *LEE-Filters*, to we wszystkich eksperymentach przeprowadzonych w ramach rozprawy zastosowana została tylko jedna kombinacja źródeł światła (jedynie światło halogenowe) i



filtrów (filtr *Qrt Yellow Mustard* 643 oraz filtr z wodnego roztworu  $\text{CuSO}_4$  otoczony osłoną ze szkła kwarcowego), która umożliwiła stworzenie spektrum odpowiadającego zakresowi światła słonecznego na głębokości 0,75 m w słupie wody w jeziorze Roś (we wrześniu 2012, Rys. 2C). Wiązka światła z ukształtowanym pożądanym wejściowym widmem wchodziła symetrycznie do każdego ze światłowodów, następnie część wiązki odbijała się od lustra i wpadała do sektora kolumny, a część wiązki przechodziła przez otwory w lustrze, pod którymi znajdują się filtry *Qrt Yellow Mustard* 643 (Rys. 10), które modyfikują skład spektralny wiązki docierającej do następnego sektora. Skład spektralny na każdej głębokości dopasowany został drogą prób i błędów za pomocą spektrofotometru światłowodowego (*USB2000-UV-VIS*). **Po siódme**, układ został wzbogacony o dodatkowe elementy (niewykorzystane w badaniach opisanych w rozprawie), które umożliwiają stworzenie w nim gradientu promieniowania UV-A oraz typowego dla stratyfikacji letniej gradientu temperatury. Gradient UV-A mógł zostać stworzony w układzie dzięki wmontowaniu do drugiego stalowego pojemnika 10 diod UV (*FoxUV<sup>TM</sup>*, z maksimum emisji przy długości fali 353 nm) oraz obecności perforowanych filtrów UV, znajdujących się pod każdym lustrem w światłowodach, które zatrzymywały UV, ale były transparentne dla światła w zakresie widzialnym (Rys. 10). Natomiast gradient termiczny mógł zostać stworzony za pomocą chłodnicy doprowadzającej schłodzoną wodę do stalowego pojemnika znajdującego się poniżej dolnego sektora każdej z kolumn (Rys. 8). **Po ósme**, został zamontowany udoskonalony system sterowania światłem, złożony ze sterownika (*single-chip microcontroller ATmega88, Atmel*) połączonego z interfejsem (*Terminal serial port emulation program*) zainstalowanym na komputerze przenośnym, umożliwiający łagodne zmiany natężenia i spektrum światła (zarówno w zakresie widzialnym, jak i UV) w cyklu dobowym poprzez możliwość niezależnej regulacji natężenia każdego z czterech źródeł światła (Rys. 10).



**Rys. 10.** Schemat elementów konstrukcyjnych finalnej wersji układu (dwóch pionowych kolumn) odpowiedzialnych za tworzenie czasowych i przestrzennych zmian w natężeniu i spektrum światła zarówno w zakresie UV-A (300-400 nm, jak i w zakresie widzialnym (400-780 nm), umożliwiających odzwierciedlenie (w skali) każdego gradientu natężenia i spektrum światła z wybranego scenariusza w jeziorze, wg. Maszczyka (2016).

## II.2.4. Eksperymenty dla parametryzacji modelu

### II.2.4.1. Zależność indywidualnego tempa wzrostu od stężenia pokarmu, zagęszczenia populacji *Daphnia*, wieku osobnika oraz od natężenia światła

Zależność indywidualnego tempa wzrostu osobników każdej z dwóch klas wiekowych *Daphnia* od stężenia pokarmu glonowego, od zagęszczenia ich populacji oraz od natężenia światła (które, jako czynnik stresowy, mogło wpływać również na tempo wzrostu, a nie tylko

na ryzyko śmierci) została wyznaczona w eksperymentach przeprowadzonych w komorach przepływowych „Lamperta”, czyli w standardowym układzie dla badania indywidualnego tempa wzrostu zwierząt planktonowych (Lampert i in. 1988), złożonym z 250 ml szklanych komór (w każdym eksperymencie po 24), zanurzonych w łaźni wodnej dla zminimalizowania wahań temperatury podczas trwania eksperymentu, do których od góry dopływało świeże medium za pomocą pompy perystaltycznej, a od dołu odpływało medium zużyte.

Przeprowadzono 8 eksperymentów (każdego trwającego po 72 h), wśród których 4 przeprowadzone zostały w stałym świetle LED (o zbliżonym spektrum do spektrum światła słonecznego, Rys. 1B), odpowiadającym natężeniu w górnym sektorze głównego układu eksperymentalnego dla weryfikacji przewidywań modelowych ( $1,2 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ) i 4 przy stałym natężeniu światła poniżej poziomu detekcji światłomierza *LI-COR 189* ( $< 0,01 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ), odpowiadającym natężeniu światła w najniższym sektorze układu eksperymentalnego dla weryfikacji przewidywań modelowych (Tabela 3). Dla każdego z natężeń światła przeprowadzone zostały po 2 eksperymenty dla każdej z dwóch klas wiekowych w taki sposób, że eksperyment rozpoczynał się od wprowadzenia do komór osobników 0,25-dniowych ( $\pm 0,25$  dnia) lub 3,25-dniowych ( $\pm 0,25$  dnia), hodowanych przed eksperymentem w  $0,8 \text{ mg C} \times \text{L}^{-1}$ ) i kończył się na wyjęciu osobników odpowiednio, 3,25- lub 6,25-dniowych ( $\pm 0,25$  dnia, Tabela 3). W każdym eksperymencie było 12 wariantów (po 2 powtórzenia): 3 stężenia pokarmu 0,05, 0,2 i  $0,8 \text{ mg C} \times \text{L}^{-1}$   $\times 4$  warianty zagęszczenia *Daphnia*: 2, 8, 32, 128 w komorze odpowiednio, 8, 32, 128 i 512 osobn.  $\times \text{L}^{-1}$ ). Media eksperymentalne zawierały kairomony rybie, o stężeniu odpowiadającemu 1 rybie na 100 litrów oraz chemiczny sygnał o zagęszczeniu *Daphnia*, odpowiadający zagęszczeniu zwierząt w danym wariantcie. Świeże media przygotowywane były w relatywnie (względem typowej procedury w eksperymentach wzrostowych przeprowadzonych na zooplanktonie i opisanych w pracy Maszczyka i Bartosiewicza (2012) krótkich odstępach (co 8 godzin) dla zminimalizowania efektu wahań stężenia pokarmu i stężenia chemicznego sygnału o obecności drapieżcy i o zagęszczeniu populacji w trakcie trwania eksperymentu. Na początku każdego eksperymentu, za pomocą binokularu z kamerą, podłączoną do komputera z zainstalowanym programem *MultiScan*, zostało sfotografowane 20 osobników losowo wybranych z kohorty osobników przeznaczonych do eksperymentu. Następnie osobniki te zostały wysuszone (przez  $> 24$  h w temperaturze  $60^\circ\text{C}$ ) i zważone (za pomocą wagi *Orion-Cahn C-35*). Tę samą procedurę powtarzano pod koniec każdego eksperymentu dla wszystkich osobników w każdym wariantcie zagęszczenia 2, 8 i 32 osobników w komorze. Indywidualne tempo wzrostu wyznaczano za pomocą wzoru  $g = (\ln C_t - \ln C_o) \times t^{-1}$ , gdzie  $C_o$

to masa ciała osobnika wprowadzanego do eksperymentu, a  $C_t$  to masa ciała pod koniec eksperymentu, a  $t$  to czas trwania eksperymentu.

**Tabela 3.** Charakterystyka eksperymentów dla sparametryzowania zależności tempa wzrostu od stężenia pokarmu, zagęszczenia populacji *Daphnia*, wieku osobnika oraz od natężenia światła. W każdym eksperymencie było 12 wariantów (4 zagęszczenia *Daphnia*  $\times$  3 stężenia pokarmu)

Numer eksperymentu	Data początku eksperymentu	Wiek <i>Daphnia</i>		Natężenie światła ( $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ )
		inicjalny (dzień)	finalny (dzień)	
E1	21.03.2015	$0,25 \pm 0,25$	$3,25 \pm 0,25$	1,20
E2	27.03.2015	$0,25 \pm 0,25$	$3,25 \pm 0,25$	< 0,01
E3	08.04.2015	$3,25 \pm 0,25$	$6,25 \pm 0,25$	1,20
E4	16.04.2015	$3,25 \pm 0,25$	$6,25 \pm 0,25$	< 0,01
E5	24.04.2015	$0,25 \pm 0,25$	$3,25 \pm 0,25$	1,20
E6	30.04.2015	$0,25 \pm 0,25$	$3,25 \pm 0,25$	< 0,01
E7	07.05.2015	$3,25 \pm 0,25$	$6,25 \pm 0,25$	1,20
E8	28.05.2015	$3,25 \pm 0,25$	$6,25 \pm 0,25$	< 0,01

#### II.2.4.2. Spowolnienie tempa wzrostu *Daphnia* w gradiencie pokarmu w wyniku braku perfekcyjnej wiedzy o zasobności każdego miejsca

Znaczenie błędu popełnianego przez *Daphnia* przy szacowaniu zasobności pokarmowej w gradiencie jego stężenia (*Materiał i metody*, II.2.2) wyznaczano dla każdej z dwóch klas wiekowych *Daphnia* w eksperymentach przeprowadzonych w głównym układzie dwóch pionowych kolumn (*Materiał i metody*, II.2.3.4) poprzez porównanie indywidualnego tempa wzrostu osobników przebywających w homogenicznie rozmieszczonym pokarmie z tempem wzrostu osobników przebywających w gradiencie pokarmu z najwyższym stężeniem w warstwie przypowierzchniowej każdej z kolumn, który odpowiadał stężeniu w wariancie z homogenicznym rozmieszczeniem pokarmu (Rys. 13). Zostało przeprowadzonych 16 eksperymentów (po 8 w każdej z 2 kolumn L i P) 72-godzinnych, 8 w homogenicznie rozmieszczonym pokarmie i 8 w gradiencie pokarmu (Tabela 4). Każdy eksperyment prowadzony był w ciemności przy natężeniu światła w całym słupie wody każdej z kolumn poniżej poziomu detekcji światłomierza *LI-COR 189* ( $< 0,01 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ). Dla każdego z dwóch wariantów eksperymentu przeprowadzone zostały 4 eksperymenty dla każdej z dwóch

klas wiekowych tak, że eksperyment rozpoczynał się od wprowadzenia do obydwu komór 6 osobników 0,25-dniowych ( $\pm 0,25$  dnia) lub 3,25-dniowych ( $\pm 0,25$  dnia), hodowanych przed eksperymentem w  $0,8 \text{ mg C} \times \text{L}^{-1}$ ) i kończył się na wyjęciu osobników odpowiednio, 3,25- lub 6,25-dniowych ( $\pm 0,25$  dnia, Tabela 4). Media eksperymentalne zawierały kairomony rybie, o stężeniu odpowiadającym 1 rybie na 100 litrów oraz chemiczny sygnał o zagęszczeniu *Daphnia*, odpowiadający zagęszczeniu 1 osobn.  $\times \text{L}^{-1}$ . Świeże media przygotowywane były co 8 godzin dla zminimalizowania efektu wahań stężenia pokarmu i stężenia chemicznego sygnału o obecności drapieżcy i o zagęszczeniu populacji w trakcie trwania eksperymentu. Dwa razy dziennie podczas każdego eksperymentu (1 h po wymianie medium i 1 h przed następną wymianą medium) monitorowane było stężenie pokarmu w każdym z 10 sektorów każdej z kolumn poprzez pobranie prób medium i odczyt stężenia za pomocą fluorometru (*TD-700*). Odstępstwa od pożądanego stężenia w danym sektorze korygowane były poprzez zwiększanie lub zmniejszanie stężenia pokarmu w mediach. Procedura wyznaczenia tempa wzrostu była analogiczna do procedury postępowania w eksperymentach dla wyznaczenia zależności tempa wzrostu od stężenia pokarmu, zagęszczenia populacji *Daphnia*, wieku osobnika oraz od natężenia światła (*Materiał i metody, II.2.4.1*). Na podstawie wyników z eksperymentów porównane zostało tempo wzrostu osobników w gradiencie pokarmu i w wariancie z homogennie rozmieszczonym pokarmem.

**Tabela 4.** Charakterystyka eksperymentów dla wyznaczenia spowolnienia tempa wzrostu *Daphnia* w gradiencie pokarmu w wyniku braku perfekcyjnej wiedzy o zasobności każdego miejsca

Numer eksperymentu	Data początku eksperymentu	Wiek <i>Daphnia</i> inicjalny (dzień)	finalny (dzień)	Gradient pokarmu	Kolumna
E1	03.09.2015	0,25 ± 0,25	3,25 ± 0,25	Obecność	L
E2	03.09.2015	0,25 ± 0,25	3,25 ± 0,25	Obecność	P
E3	09.09.2015	0,25 ± 0,25	3,25 ± 0,25	Brak	L
E4	09.09.2015	0,25 ± 0,25	3,25 ± 0,25	Brak	P
E5	16.09.2015	3,25 ± 0,25	6,25 ± 0,25	Obecność	L
E6	16.09.2015	3,25 ± 0,25	6,25 ± 0,25	Obecność	P
E7	24.09.2015	3,25 ± 0,25	6,25 ± 0,25	Brak	L
E8	24.09.2015	3,25 ± 0,25	6,25 ± 0,25	Brak	P
E9	02.10.2015	0,25 ± 0,25	3,25 ± 0,25	Obecność	L
E10	02.10.2015	0,25 ± 0,25	3,25 ± 0,25	Obecność	P
E11	09.10.2015	0,25 ± 0,25	3,25 ± 0,25	Brak	L
E12	09.10.2015	0,25 ± 0,25	3,25 ± 0,25	Brak	P
E13	15.10.2015	3,25 ± 0,25	6,25 ± 0,25	Obecność	L
E14	15.10.2015	3,25 ± 0,25	6,25 ± 0,25	Obecność	P
E15	24.10.2015	3,25 ± 0,25	6,25 ± 0,25	Brak	L
E16	24.10.2015	3,25 ± 0,25	6,25 ± 0,25	Brak	P

#### II.2.4.3. Zależność odległości reakcji ryby planktonożernej od natężenia i składu spektralnego światła w zakresie widzialnym

Zależność odległości reakcji od natężenia i składu spektralnego światła u młodocianej wzdregi (5-6 cm) została wyznaczona dla każdej z dwóch klas wiekowych *Daphnia* w układzie eksperymentalnym skonstruowanym dla precyzyjnej obserwacji zachowań pokarmowych indywidualnych ryb w stałym zagęszczeniu planktonowych ofiar, otrzymywanym poprzez uzupełnianie zjedzonych ofiar w trakcie eksperymentu (Bartosiewicz i Gliwicz 2011, Rys. 11). Układ ten był złożony z dwóch połączonych ze sobą szklanych zbiorników, jednego eksperymentalnego (wysokość - 66 cm, długość - 150 cm i szerokość - 15 cm, o objętości = 148,5 L), w którym obserwowane było żerowanie ryb podczas eksperymentu, i drugiego "inicjalnego" (wysokość - 30 cm, długość - 30 cm i szerokość 15

cm, o objętości 13,5 L), w którym znajdowały się ryby przed eksperymentem (Rys. 11). Zbiorniki były przedzielone zasuwą (zbudowaną z siatki planktonowej - 0,16 mm średnicy otworów - otoczonej szklaną ramą) otwieraną na początku każdego eksperymentu. Obydwa zbiorniki otoczone były ze wszystkich stron czarną folią z wyjątkiem przedniej ściany zbiornika eksperymentalnego (wykonanej ze szkła kwarcowego, odpornego na zarysowania i jeszcze bardziej przezroczystego, niż standardowe szkło sodowe) z narysowaną na niej centymetrową podziałką, umożliwiającą precyzyjne mierzenie prędkości pływnięcia ryby i wyznaczanie odległości reakcji ryby względem planktonowych ofiar na zarchiwizowanym na dysku komputera nagraniu z kamery. W zbiorniku eksperymentalnym zamontowany był dozownik, rozpoczynający się lejkiem, umożliwiający sprawne uzupełnianie zjedzonych ofiar w trakcie eksperymentu. Równomierne rozmieszczenie zooplanktonu podczas eksperymentu gwarantował przepływ wody generowany przez pompkę wodną (*EHEIM 1000.220*) umieszczoną w małym zbiorniku z rybami, która wprowadzała wodę w subtelny cykl. Dodatkowo równomierne rozmieszczenie zooplanktonu w trakcie eksperymentu gwarantowane było również przez rozgałęzienie dozownika. W 120 L zbiorniku znajdowała się również większa pompa zanurzeniowa (*TUNZE Silence 1073.040*), która służyła do sprawnego napełniania wodą układu na początku każdego eksperymentu. Układ był oddzielony od stanowiska obserwacyjnego kurtyną z czarnego materiału, w której znajdowały się prostokątne otwory, umożliwiające obserwowanie zachowania ryb w trakcie eksperymentu oraz nagrywanie, za pomocą kolorowej kamery, dla późniejszego przeanalizowania zachowania ryb na filmach. Kurtyna była ustawiona w takiej odległości od akwarium, aby obraz z kamery, z jednej strony był na tyle odsunięty od akwarium eksperymentalnego, aby je całe obejmował, a z drugiej strony był na tyle blisko, aby precyzyjnie można było śledzić ruch każdej ryby. Od góry układu padało światło z dwóch lamp ledowych (*PX 203 3 × 3 W*), każdej złożonej z 9 diod (po trzy diody świecące w różnym zakresie długości fali z maksimum emisji przy 460, 520 i 680 nm odpowiadającym niebieskiemu, zielonemu i czerwonemu kolorowi), co pozwalało na przeprowadzanie eksperymentów zarówno w świetle monochromatycznym (w jednym z trzech kolorów), jak również w świetle białym (będącym kombinacją trzech barw, tworzącą spektrum zbliżone do spektrum na Rysunku 1B). Zanim światło docierało do zbiornika eksperymentalnego, przechodziło przez matową pleksi, która rozpraszała wiązki światła dając równomierne oświetlenie wnętrza akwarium. Lampy LED podłączone były do sterownika (*PX 184*), umożliwiającego (za pomocą komputera z zainstalowanym programem *PX Light 145*)

automatyczną lub ręczną regulację natężenia światła osobno w każdym z 3 kolorów (w zakresie od 0 do  $3,0 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ).

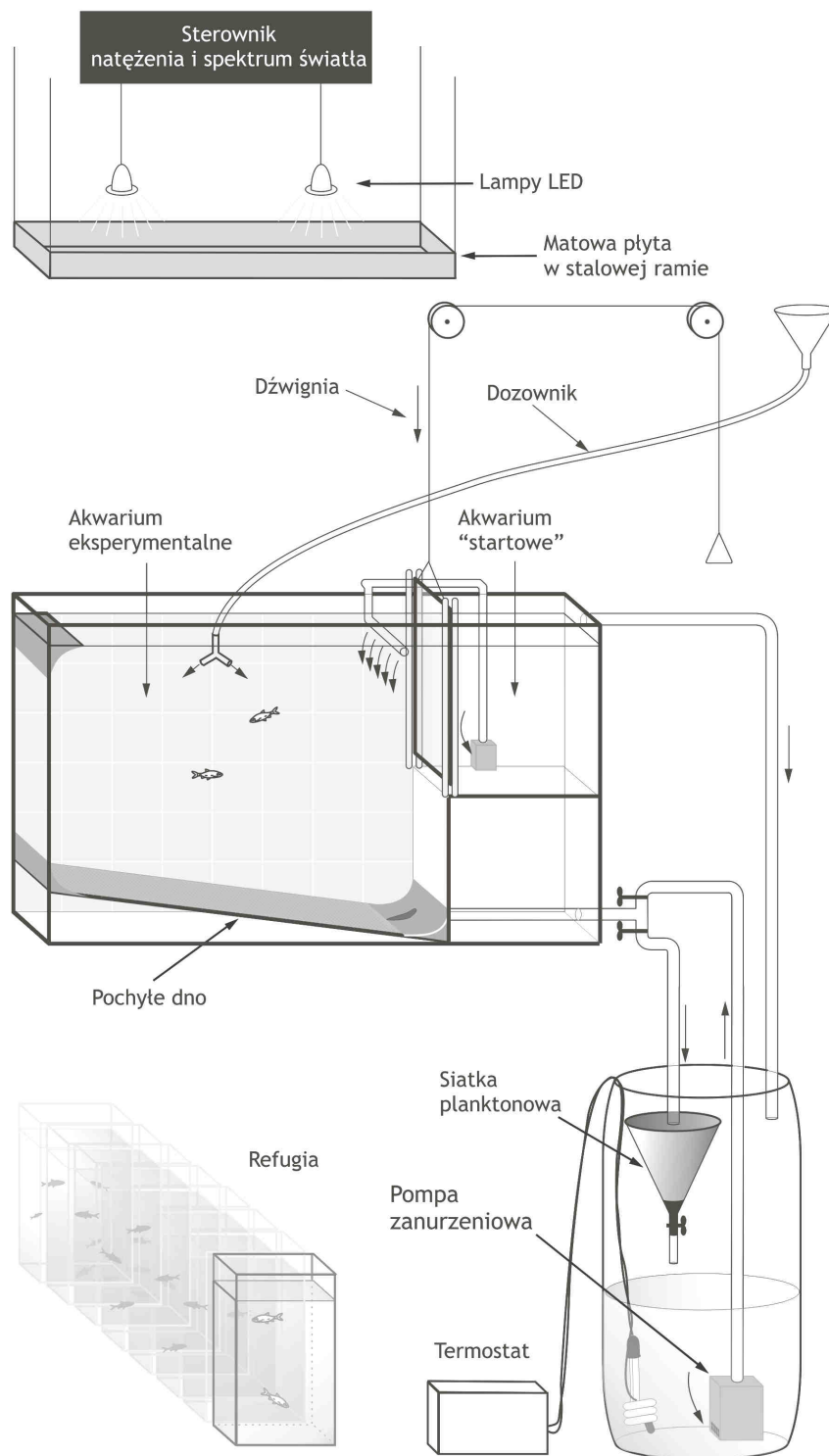
Przeprowadzone zostało 36 eksperymentów: dla każdej z dwóch klas wiekowych *Daphnia*, w dwóch natężeniach światła 1,20 oraz  $0,65 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , dla trzech podstawowych dla tego źródła światła zakresów długości fali, odpowiadającym trzem kolorom (czerwonemu, zielonemu i niebieskiemu) i w trzech powtórzeniach dla 3 różnych par ryb (2 klasy wiekowe  $\times$  2 natężenia światła  $\times$  3 kolory światła  $\times$  3 powtórzenia = 36, Tabela 5). Natężenia światła zostały tak dobrane, aby wyższe natężenie było bliskie najwyższemu natężeniu w trzeciej (właściwej) wersji układu eksperymentalnego dla badania rozmieszczenia zooplanktonu (*Materiał i metody*, II.2.3.4) w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych, a natężenie niższe było na tyle wysokie, aby umożliwiało jeszcze swobodną obserwację ryb zarówno podczas eksperymentu, jak również na zarchiwizowanym obrazie z kamery. Ryby żerowały w parach, a nie osobno, ponieważ każda z ryb była wtedy śmielsza (szybciej rozpoczynała żerowanie i miała większe tempo żerowania), co pozwalało na sprawniejsze przeprowadzenie eksperymentów. Ze względu na to, że różne długości fali świetlnej mają różną energię, dla każdego z trzech kolorów światła ustalany był indywidualnie poziom każdego z dwóch natężeń za pomocą spektrofotometru światłowodowego (USB2000-UV-VIS). Pozwoliło to na zbadanie wpływu długości fali na odległość reakcji i tempo konsumpcji ryby planktonożernej w tym samym natężeniu światła, mierzonym jako liczba kwantów światła (o danej długości fali) pomnożona przez ich energię. W trakcie jednego dnia przeprowadzane były eksperymenty w jednym kolorze światła, a każda z par ryb aklimowana była do danego koloru światła przez dobę przed rozpoczęciem eksperymentu. Na początku każdego eksperymentu odliczane były porcje *Daphnia*, wprowadzane w małej ilości wody do plastikowych pojemników, zarówno dla ustalenia inicjalnego zagęszczenia w eksperymencie (40 osobników,  $0,5 \text{ osobn.} \times \text{L}^{-1}$ ), jak również dla uzupełniania zjedzonych ofiar po każdych dziesięciu zaobserwowanych atakach (10 osobników). Następnie, wprowadzane były do akwarium eksperymentalnego *Daphnia* dla ustalenia inicjalnego zagęszczenia, włączane było nagrywanie obrazu przez kamerę i otwierana była zasłona oddzielająca akwarium eksperymentalne z *Daphnia* i akwarium z rybami. Po każdych dziesięciu zaobserwowanych atakach, kolejne porcje ofiar wprowadzane były dozownikiem do akwarium dla ustalenia relatywnie stałego zagęszczenia zooplanktonu podczas eksperymentu. Każdy eksperyment trwał 5 minut (od momentu zaobserwowania pierwszego ataku), po tym czasie gaszone było światło i wyławiane były ryby przy użyciu noktowizora, który umożliwiał widzenie w ciemności, i za pomocą siatki w stalowej ramie o



kształcie dopasowanym do kształtu akwarium eksperymentalnego. Para ryb umieszczana były w refugium, czyli w 6 litrowym akwarium z napowietrzaną wodą. Następnie, otwierany był zawór na odpływie grawitacyjnym i spuszczana była cała woda z układu przez siatkę planktonową, zlokalizowaną nad 120 L zbiornikiem, dla zebrania wszystkich niezjedzonych ofiar po eksperymencie. Następnie akwarium było płukane dodatkową ilością wody, zbieraną również do siatki planktonowej. Z różnicy między liczbą dodanych *Daphnia* i liczbą pozostałych po eksperymencie wyliczane było tempo żerowania ryb (dzieląc wynik różnicy przez liczbę żerujących ryb i przez czas trwania eksperymentu). Odległość reakcji, czyli droga przebyta przez rybę od zainicjowania ataku do pochwycenia ofiary, mierzona była na zarchiwizowanych filmach, wykorzystując program *VirtualDub 1.10.4*, umożliwiający odtwarzanie filmu klatka po klatce. Odległość reakcji wyznaczana była za pomocą linijki na ekranie monitora, skalując pomiary względem podziałki na przedniej szybie akwarium eksperymentalnego.

**Tabela 5.** Charakterystyka eksperymentów dla wyznaczenia zależności odległości reakcji ryby planktonożerne od natężenia i składu spektralnego światła (*Materiał i metody, II.2.4.3*). Barwa światła zawierała się odpowiednio w zakresach: 400-480 nm (światło niebieskie), 500-590 nm (zielone) i 640-760 nm (czerwone)

Numer eksperymentu	Data	Wiek <i>Daphnia</i> (dzień)	Natężenie światła $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$	Barwa światła	Numer pary ryb
E1	10.12.2014	5,5	1,20	Zielona	1
E2	10.12.2014	5,5	1,20	Zielona	3
E3	10.12.2014	5,5	1,20	Zielona	2
E4	13.12.2014	5,5	0,65	Zielona	1
E5	13.12.2014	5,5	0,65	Zielona	3
E6	13.12.2014	5,5	0,65	Zielona	2
E7	15.12.2014	2,5	1,20	Zielona	1
E8	15.12.2014	2,5	1,20	Zielona	3
E9	15.12.2014	2,5	1,20	Zielona	2
E10	12.12.2014	2,5	0,65	Zielona	1
E11	12.12.2014	2,5	0,65	Zielona	3
E12	12.12.2014	2,5	0,65	Zielona	2
E13	03.12.2014	5,5	1,20	Niebieska	1
E14	03.12.2014	5,5	1,20	Niebieska	3
E15	03.12.2014	5,5	1,20	Niebieska	2
E16	06.12.2014	5,5	0,65	Niebieska	1
E17	06.12.2014	5,5	0,65	Niebieska	3
E18	06.12.2014	5,5	0,65	Niebieska	2
E19	28.11.2014	2,5	1,20	Niebieska	1
E20	28.11.2014	2,5	1,20	Niebieska	3
E21	28.11.2014	2,5	1,20	Niebieska	2
E22	01.12.2014	2,5	0,65	Niebieska	1
E23	01.12.2014	2,5	0,65	Niebieska	3
E24	01.12.2014	2,5	0,65	Niebieska	2
E25	25.11.2014	5,5	1,20	Czerwona	1
E26	25.11.2014	5,5	1,20	Czerwona	3
E27	25.11.2014	5,5	1,20	Czerwona	2
E28	26.11.2014	5,5	0,65	Czerwona	1
E29	26.11.2014	5,5	0,65	Czerwona	3
E30	26.11.2014	5,5	0,65	Czerwona	2
E31	27.11. 2014	2,5	1,20	Czerwona	1
E32	27.11. 2014	2,5	1,20	Czerwona	3
E33	27.11. 2014	2,5	1,20	Czerwona	2
E34	06.12. 2014	2,5	0,65	Czerwona	1
E35	06.12. 2014	2,5	0,65	Czerwona	3
E36	06.12. 2014	2,5	0,65	Czerwona	2



**Rys. 11.** Zmodyfikowany układ eksperymentalny Bartosiewicza i Gliwicz (2011) wykorzystany dla obserwacji zachowań pokarmowych ryb planktonożernych żerujących w stałym zagęszczeniu planktonowych ofiar.

#### **II.2.4.4. Zależność ryzyka śmierci *per capita* ze strony ryby planktonożernej od zagęszczenia populacji zooplanktonu**

Przebieg ryzyka śmierci w zależności od zagęszczenia populacji zooplanktonu został wyznaczony na podstawie eksperymentów przeprowadzonych w relatywnie (względem innych układów laboratoryjnych wykorzystywanych dotychczas dla wyznaczenia tej zależności) dużym systemie eksperymentalnym zlokalizowanym w laboratorium budynku Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych (CENT3) Uniwersytetu Warszawskiego (Rys. 12, Gliwicz i Maszczyk w przygotowaniu). Na system ten składały się 2 identyczne układy złożone z dziesięciu 200-litrowych (połączonych w koło) zbiorników zbudowanych z nietoksycznego włókna poliestrowo-szklanego. Sąsiadujące zbiorniki połączone były przewężeniami, które z jednej strony, umożliwiały swobodne przemieszczanie się ryb między zbiornikami, a z drugiej strony, utrudniały zwierzętom planktonowym przemieszczanie się między nimi. Na każdym przewężeniu znajdowała się obrotowa tarcza, na której można było ustawić ręcznie albo pozycję zamykającą połączenie, albo jedną z trzech pozycji z otworami o różnej średnicy (8, 12 lub 15 cm, Rys. 12 A i B). Podczas wszystkich eksperymentów otwarte były połączenia o średnicy 12 cm. Dno każdego ze zbiorników było pochyłe, aby łatwiej spływały fekalia ryb do odpływu znajdującego się w jednym z rogów. W dnie było również zamontowane napowietrzanie, które mogło być włączane i wyłączane zdalnie za pomocą zaworu. Nad dnem, prostopadle do ścian każdego zbiornika, umieszczona była stalowa, perforowana (20 otworów o średnicy 0.8 cm) czarna płyta, która stanowiła rzeczywiste dno dla żerujących ryb. Otwory w płytach umożliwiały przedostawanie się do wnętrza zbiornika powietrza z systemu napowietrzającego. Każdy ze zbiorników połączony był w obiegu zamkniętym z oczyszczalnią mechaniczno-biologiczną z osadnikiem i osadem czynnym, do której dopływała grawitacyjnie woda przez odpływ w dnie oraz system rur. Oczyszczona woda była pompowana za pomocą pompy zanurzonej w oczyszczalni do 1000 litrowego zbiornika retencyjnego, z którego spływała grawitacyjnie do każdego ze zbiorników obydwu układów za pomocą systemu rur, zamykając obieg. Obieg mógł być w każdej chwili zamknięty za pomocą zaworów. Temperatura w układzie utrzymywana była na stałym poziomie za pomocą zarówno termostatu, regulującego temperaturę wody, zanurzonego w zbiorniku retencyjny (*Airland HP Booster Technology*), jak również termostatu, regulującego temperaturę powietrza (*EWT model CFH120*, 12 kW), umieszczonego w laboratorium, w którym znajdował się układ. We wszystkich eksperymentach przeprowadzonych dla wyznaczenia zależności ryzyka śmierci od zagęszczenia zooplanktonu temperatura wody w

systemie wynosiła  $21,0 \pm 0,2$  °C. System oświetlany był przez 10 lamp ledowych (*Led PAR 64 RGBA*), ustawionych w dwóch szeregach, po jednym nad każdym układem. Każda lampa złożona była z 64 diod (po 16 diod świecących w różnym zakresie długości fali z maksimum emisji przy 460, 520, 600 i 680 nm, odpowiadającym niebieskiemu, zielonemu, pomarańczowemu i czerwonemu kolorowi), co pozwalało na przeprowadzanie eksperymentów zarówno w świetle monochromatycznym (w jednym z czterech kolorów), jak również w świetle białym (będącym kombinacją czterech barw, ustawionej tak, aby łączne spektrum było zbliżone do spektrum na Rysunku 1B). Światło emitowane przez lampy było rozpraszane przez matową pleksi umieszczoną na stalowym stelażu nad systemem. Lampy podłączone były do sterownika (*PX 185*), umożliwiającego (za pomocą komputera z zainstalowanym programem *PX Light145*) automatyczną lub ręczną regulację natężenia światła osobno w każdym z 4 kolorów (w zakresie od 0 do  $2,0 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ). Światło było ustawione w cyklu dobowym z zasymulowanym wschodem i zachodem słońca symulując zmiany natężenia światła w okresie letnim. System wyposażony był w 4 podwodne kamery, które podczas każdego eksperymentu ustawiane były na stelażach w 4 wybranych zbiornikach tak, że obiektyw kamery był zanurzony 1cm pod powierzchnią wody, co pozwalało na otrzymywanie wyraźnego obrazu pozbawionego odbić od powierzchni i na obejmowanie całego wnętrza zbiornika. Każda z kamer połączona była z monitorem, co umożliwiało prawidłowe ich ustawienie przed eksperymentem oraz z rejestratorem obrazu, na którym archiwizowane były filmy. System wyposażony był również w cztery karmniki (po dwa na każdy układ), które umożliwiały równoczesne wprowadzenie określonej liczby ofiar planktonowych do każdego z 20 zbiorników przez dwie osoby (Rys. 12C).

Duży rozmiar tego systemu eksperymentalnego i możliwość podzielenia każdego z układów tego systemu na sektory miał swoje zalety, jak również i wady, w porównaniu do tradycyjnych małych układów eksperymentalnych (Tabela 1), w których dotychczas wyznaczany był przebieg ryzyka śmierci wywołany przez drapieżnictwo ryby planktonożernej w zależności od zagęszczenia populacji zooplanktonu (oraz przebieg odpowiedzi funkcjonalnej). Zaletą przeprowadzenia eksperymentów w dużym systemie była możliwość zbadania zależności w warunkach zbliżonych do naturalnych poprzez (1) zmniejszenie wpływu ścian zbiornika eksperymentalnego na swobodę ruchu ryb, w tym na możliwość regulowania przez nie prędkości płynięcia w zależności od zagęszczenia ofiar planktonowych w polu widzenia, (2) stwarzanie równomiernego lub skupiskowego rozmieszczenia tej samej liczby ofiar planktonowych, i (3) uwzględnienie interakcji między rybami (konkurencji zmniejszającej efektywność żerowania oraz procesów uczenia się

poprzez podpatrywania zachowania innych osobników zwiększających efektywność żerowania). Istotną komplikacją wynikającą z dużych rozmiarów układów była konieczność wykorzystywania kilku-kilkudziesięciu tysięcy planktonowych ofiar w każdym eksperymencie, co wymusiło zastąpienie *Daphnia* wykorzystywanej we wszystkich pozostałych eksperymentach przeprowadzonych w ramach rozprawy, na łatwiejsze i „szybsze” w hodowli naupliusy *Artemia* uzyskiwane z jaj. Drugą wadą wynikającą z dużych rozmiarów układu był brak możliwości utrzymywania zagęszczeń zooplanktonu w trakcie eksperymentu na stałym poziomie poprzez uzupełnianie zjedzonych ofiar. Zamiast tego uwzględniono ubywanie ofiar przy szacowaniu tempa konsumpcji, stosując dodatkowy trik obliczeniowy (scałkowanie wzoru na tempo konsumpcji, *Materiał i metody*, II.2.2, wzór 17).

Przeprowadzonych zostało 48 eksperymentów między sierpniem i listopadem 2014 roku (Tabela 6), w każdym z nich żerowało 100 ryb w jednym z dwóch układów (panel A, Rys. 12) w homogenie (w każdym zbiorniku po tyle samo osobników) rozmieszczonej *Artemia*., podczas gdy w drugim z bliźniaczych układów obserwowano żerowanie takiej samej grupy ryb na *Artemia* rozmieszczonej skupiskowo (wyniki porównania żerowania ryb na ofiarach rozmieszczonych równomiernie i skupiskowo opisane są w pracy Gliwicz i Maszczyk (w przygotowaniu). Każdy eksperyment trwał od 6 do 12 minut i przeprowadzany był podczas symulowanego zachodu słońca, z tym, że na 20 minut przed eksperymentem oraz na czas trwania eksperymentu kontroler światła ustawiany był z trybu automatycznego na manualny z ustalonym stałym natężeniem światła  $1,2 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1} \pm 0,4$ , odpowiadającym natężeniu w górnym sektorze głównego układu eksperymentalnego dla weryfikacji prognoz modelowych. Przed rozpoczęciem eksperymentu, zmniejszana była intensywność napowietrzania tak, aby turbulencje powstałe w wyniku napowietrzania powodowały subtelne mieszanie wody w każdym zbiorniku, utrzymując względnie równomierne rozmieszczenie zooplanktonu w każdym z nich, ale aby nie uszkadzały zwierząt planktonowych. Zamykane były zawory, które odcinały połączenie z oczyszczalnią i zbiornikiem retencyjnym, montowane były kamery w taki sposób by w każdym kolejnym eksperymencie ustawione zostały w zbiorniku oddalonym o trzy zbiorniki względem poprzedniego eksperymentu. Przed rozpoczęciem eksperymentu przygotowywane były również porcje inicjalnej liczby *Artemia* niezbędnej do dodania do każdego zbiornika dla ustalenia w nich inicjalnego zagęszczenia. Procedura przygotowania takiej porcji rozpoczynała się od ustalenia, na podstawie oszacowania liczby osobników w każdej z trzech podprób (o objętości 50 ml), pożądanej całkowitej liczby *Artemia* w 5 litrowym zbiorniku niezbędnej do dodania do wszystkich zbiorników łącznie. Po ustaleniu tej liczby brane były trzy kolejne próby zerowe (o

objętości 50 ml) dla późniejszego precyzyjnego policzenia na utrwalonym materiale osobników dodawanych inicjalnie do każdego zbiornika. Pozostała objętość wody (4900 ml) z naupliusami *Artemia* dzielona była na dwie równe objętościowo połowy, każda przeznaczona dla jednego z dwóch układów. Połowa przeznaczona dla układu z homogennym rozmieszczenie ofiar dzielona była na 10 równych porcji, połowa przeznaczona dla układu ze skupiskowym rozkładem ofiar dzielona była na 1 porcję z 91 procentami osobników oraz 9 porcji z 1 procentem osobników każda. Następnie ustawiane były karmniki na układach i umieszczane w nich wszystkie 10 porcji *Artemia* oraz włączane kamery (Rys. 12C).

Eksperyment rozpoczynał się od równoczesnego wiania wszystkich porcji *Artemia* do każdego zbiornika w obu układach, następnie karmniki były usuwane (przenoszone na statyw umieszczony na ścianie) i eksperyment się rozpoczynał. Każdy eksperyment kończył się zgaszeniem światła w laboratorium. Następnie, przy wykorzystaniu noktowizorów zamykane były wszystkie połączenia między zbiornikami, wyłączane kamery i przenoszone wraz ze statywami poza obręb układów tak, aby nie przeszkadzały podczas pobierania prób. Za pomocą specjalnie do tego celu skonstruowanej siatki (z 0,5 cm otworami, zatrzymującymi ryby, ale przepuszczającymi zwierzęta planktonowe), otoczonej prostokątną stalową ramką, dopasowaną swoim kształtem do kształtu zbiornika, wyławiane były ryby z jednego ze zbiorników. Następnie z tego samego zbiornika, za pomocą dwóch zaciągów, wykonanych siatką planktonową, również dopasowaną do kształtu zbiornika i specjalnie skonstruowaną do brania prób planktonowych w tym systemie eksperymentalnym (Rys. 12D), wyławiane były niezjedzone *Artemia*). Wstępne eksperymenty wykazały, że dwa zaciągi wystarczały, aby wyłowione zostało > 95% *Artemia* ze zbiornika. Następnie, wszystkie ryby z pozostałych 9 zbiorników przenoszone były do zbiornika, z którego zostały wyłowione *Artemia*. Następnie (już przy zapalonym świetle), wyławiane były niezjedzone zwierzęta planktonowe ze wszystkich pozostałych 9 zbiorników. Na koniec, otwierane były połączenia między zbiornikami oraz zawory umożliwiające połączenie wody w układach z oczyszczalnią i zbiornikiem retencyjnym, włączane było silniejsze napowietrzanie i ustawiany był z powrotem automatyczny tryb zmian natężenia światła. Próby z *Artemia* były zagęszczane i utrwalane formaliną dla późniejszego ich policzenia.

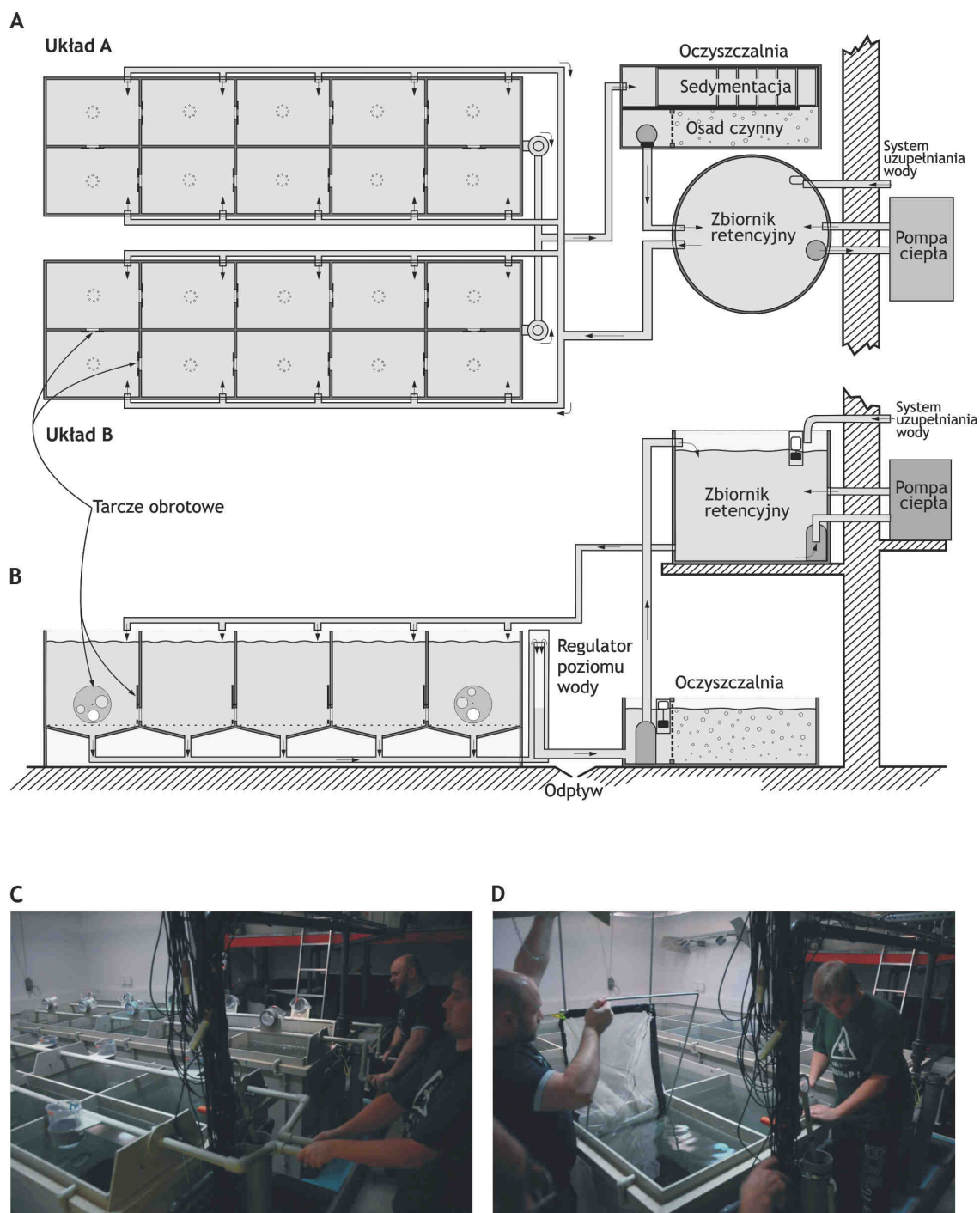
Dla każdego eksperymentu wyznaczane było inicjalne (na podstawie prób "zerowych") oraz finalne (na podstawie prób końcowych) zagęszczenie *Artemia* (jako uśredniona wartość z 10 zbiorników) oraz liczona była średnia liczba ryb w każdej minucie eksperymentu na zarejestrowanych filmach dla dwóch (z dziesięciu) zbiorników. Szacowane było również tempo konsumpcji ryby żerującej na zooplanktonie przez podzielenie liczby zjedzonych ofiar

przez liczbę ryb i przez czas trwania eksperymentu. Dla każdego eksperymentu wyliczone zostało również średnie zagęszczenie zooplanktonu w trakcie eksperymentu (zakładając prostoliniowy spadek tego zagęszczenia). W ten sposób możliwe było stworzenie zależności tempa konsumpcji od zagęszczenia populacji zooplanktonu (odpowiedzi funkcjonalnej). Podzielenie każdej wartości tempa konsumpcji przez zagęszczenie populacji pozwoliło natomiast wyznaczyć dla każdej wartości ryzyko śmierci *per capita*.

Oprócz głównych 48 eksperymentów, przeprowadzone zostały 3 eksperymenty dodatkowe, każdy z nich w jednym zbiorniku (odizolowanym od pozostałych) w układzie A, w których 10 ryb żerowało przez 8 minut w ekstremalnie wysokim zagęszczeniu *Artemia* ( $400 \text{ osobn.} \times \text{L}^{-1}$ ). W eksperymentach tych procedura oszacowania zagęszczenia inicjalnego i finalnego *Artemia* oraz wyznaczenia tempa konsumpcji ofiar była taka sama, jak w eksperymentach głównych przeprowadzonych w całym układzie. Eksperymenty te posłużyły dla wyznaczenia czasu manipulacji ofiarą ( $T_h$ ), zdefiniowanego w treści rozprawy jako czasu potrzebnego drapieżcy na dopłynięcie do ofiary, schwytanie jej, zjedzenie i gotowość do ataku na następną ofiarę (czyli całkowitego czasu między dwoma następującymi po sobie atakami w sytuacji, gdy ze względu na duże zagęszczenie ofiar czas poszukiwania ofiary można pominąć).  $T_h$  został wyznaczony (w sekundach, Tabela 2) ze średniej (z 3 eksperymentów) różnicy między inicjalną i finalną liczbą *Artemia* podzieloną przez liczbę ryb w każdym eksperymentcie i podzieloną przez czas trwania każdego eksperymentu (480 sekund).

Prędkość ryby mierzona była za pomocą programu *VirtualDub 1.10.4*, umożliwiającego odtwarzanie filmu na dużym zwolnieniu, poprzez mierzenie odległości, jaką przebyła ryba w danym czasie, za pomocą linijki na ekranie monitora, skalując odczytane długości względem podziałki na przedniej szybie akwarium eksperymentalnego. Pomiaru przeprowadzane były dla losowo wybranych ryb pojawiających się w obrazie monitora (w trzech losowo wybranych eksperymentach, w każdym po 5 pomiarów dla 2 z 10 zbiorników,  $n = 3 \times 5 \times 2 = 30$ ) i klasyfikowane były, albo jako prędkości podczas przemieszczania się ryb, albo jako prędkości podczas żerowania. Rozróżnienie między tymi dwiema prędkościami było łatwe ze względu na wyraźne różnice w sposobie pływania ryb przemieszczających się (długotrwałe płynięcie w jednej linii bez zwalniania) i ryb żerujących (ciągła zmiana kierunku pływania, i ciągłe zwalnianie i przyspieszanie). W modelu uwzględniona została jedynie prędkość podczas żerowania (Tabela 2).





**Rys. 12.** System eksperymentalny umożliwiający badanie zachowań pokarmowych grupy ryb w równomiernie lub skupiskowo rozmieszczonym zooplanktonie, złożony z dwóch identycznych układów, podzielonych na 10 zbiorników połączonych przewężeniami, połączonych w obieg zamknięty z oczyszczalnią biologiczno-mechaniczną i ze zbiornikiem retencyjnym na wodę oczyszczoną (wg. Gliwicz i Maszczyka, w przygotowaniu): (A) widok systemu z góry, (B) widok systemu z boku, (C) dozowanie porcji zooplanktonu za pomocą karmników, (D) wyławianie niezjedzonych ofiar planktonowych po zakończeniu sesji pokarmowej.

**Tabela 6.** Charakterystyka 48 eksperymentów przeprowadzonych dla wyznaczenia kształtu odpowiedzi funkcjonalnej oraz zależności ryzyka śmierci *per capita* ze strony ryby planktonożernej od zagęszczenia populacji zooplanktonu (eksperymenty dla parametryzacji modelu, *Materiał i metody*, II.2.4.4) oraz 3 dodatkowych eksperymentów dla wyznaczenia czasu manipulacji ofiarą ( $T_h$ ) przeprowadzonych w dużym systemie eksperymentalnym, który umożliwia badanie zachowań pokarmowych dużej grupy ryb (Rys. 12)

Numer eksperymentu	Data	Czas trwania eksperymentu (min)	Liczba ryb w eksperymencie	Zagęszczenie <i>Artemia</i>	
				inicjalne osobn. $\times L^{-1}$	finalne osobn. $\times L^{-1}$
E1	01.08.2014	12	105	1,81	0,01
E2	02.08.2014	12	105	1,86	0,25
E3	05.08.2014	8	102	2,89	0,68
E4	06.08.2014	8	102	2,99	0,47
E5	11.08.2014	10	105	2,55	0,73
E6	12.08.2014	10	105	2,48	0,49
E7	17.08.2014	10	105	2,82	0,44
E8	18.08.2014	12	105	3,17	0,56
E9	19.08.2014	13	105	2,67	0,30
E10	24.08.2014	12	104	2,21	0,63
E11	25.08.2014	10	102	2,40	0,63
E12	26.08.2014	12	102	2,95	0,63
E13	27.08.2014	12	102	1,09	0,39
E14	01.09.2014	10	102	1,68	0,37
E15	03.09.2014	10	102	2,62	0,63
E16	04.09.2014	10	102	2,08	0,51
E17	05.09.2014	10	102	1,58	0,45
E18	07.09.2014	9	102	0,91	0,36
E19	08.09.2014	6	102	2,18	0,63
E20	09.09.2014	6	102	3,04	0,90
E21	10.09.2014	6	102	13,06	2,76
E22	11.09.2014	7	101	0,84	0,35
E23	13.09.2014	7	101	2,38	0,85
E24	15.09.2014	7	101	2,51	0,60
E25	16.09.2014	10	101	8,79	0,02
E26	17.09.2014	6	101	3,44	2,31
E27	20.09.2014	10	101	1,86	0,31
E28	22.09.2014	10	101	2,39	0,58
E29	23.09.2014	6	101	1,67	0,77
E30	24.09.2014	8	101	2,33	0,74
E31	25.09.2014	8	101	6,03	1,81
E32	26.09.2014	8	101	8,76	1,83
E33	28.09.2014	8	101	1,36	0,37
E34	29.09.2014	6	101	0,50	0,37
E35	01.10.2014	6	101	0,67	0,46
E36	03.10.2014	8	100	8,50	2,53
E37	04.10.2014	6	100	2,41	1,05
E38	05.10.2014	6	100	2,45	1,11
E39	06.10.2014	10	100	3,54	0,31
E40	09.10.2014	10	100	2,70	0,93
E41	10.10.2014	10	100	2,80	0,73
E42	11.10.2014	10	100	1,05	0,63
E43	28.10.2014	10	100	1,91	0,23
E44	01.11.2014	8	100	17,37	4,42
E45	02.11.2014	10	100	8,40	1,20
E46	03.11.2014	8	100	25,20	12,17
E47	04.11.2014	8	100	32,77	18,44
E48	05.11.2014	8	100	16,38	2,03
EI	16.11.2014	8	10	401,13	375,53
EII	16.11.2014	8	10	369,22	348,42
EIII	16.11.2014	8	10	430,17	405,77

## **II.2.5. Eksperymenty rzeczywiste dla weryfikacji prognoz modelowych**

### **II.2.5.1. Informacje ogólne**

Dla zbadania rozmieszczenia zwierząt planktonowych w gradiencie pokarmu i w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy, zostało przeprowadzone łącznie 454 eksperymentów w trzech układach eksperymentalnych (*Materiał i metody*, II.2.3). Za osobny eksperyment uznane zostało zbadanie rozmieszczenia *Daphnia* w lewej i w prawej kolumnie każdego układu, pomimo tego, że obserwacje te przeprowadzone zostały w tym samym czasie. Z drugiej strony, efekt kolumny został uwzględniony w analizie statystycznej danych (*Materiał i metody*, II.2.7). Wszystkie eksperymenty przeprowadzone zostały w laboratoriach Zakładu Hydrobiologii (pomieszczeniach ze ścianami pomalowanymi na czarny kolor dla zminimalizowania ilości światła od nich odbijanego) w temperaturze 21 °C (stała temperatura utrzymywana była również między eksperymentami).

Jedynie wyniki z 344 eksperymentów (Tabela 7, 8a, 8b i 9a-c), przeprowadzonych we właściwej (trzeciej) wersji układu (*Materiał i metody*, II.2.3.4), zostały opisane w treści rozprawy i wykorzystane dla weryfikacji opisanych w niej hipotez. Wyniki otrzymane w eksperymentach przeprowadzonych we wcześniejszych dwóch wersjach układu (50 eksperymentów w układzie pierwszym i 60 eksperymentów w układzie drugim) zostały odrzucone, ponieważ rozmieszczenie *Daphnia* w tych eksperymentach zależało istotnie nie tylko od gradientu pokarmu i gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy, ale również od konstrukcyjnych rozwiązań zastosowanych w układach dla stworzenia gradientów. Uniemożliwiało to więc wykorzystanie tych wyników dla zweryfikowania hipotezy rozprawy, ponieważ inne czynniki wpływały na rozmieszczenie wirtualnych *Daphnia* w symulacjach, a inne na ich rozmieszczenie w eksperymentach rzeczywistych. W układzie pierwszym, główny problem wynikał z orientacji tego układu w poziomie. Okazało się, że nawet po 3-4 dniach rozmieszczenie *Daphnia* w gradiencie pokarmu nie było w stanie równowagi, ponieważ *Daphnia* nie są mobilne w tej płaszczyźnie. Dodatkowo, zbyt proste rozwiązania konstrukcyjne dla stworzenia gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (nagle, a nie stopniowe, tworzenie gradientu informacji o niebezpieczeństwie oraz nieuwzględnienie spektrum światła, jako jednego z ważnych komponentów informacji o niebezpieczeństwie, *Materiał i metody*, II.2.3.2) mogły powodować, że gradient światła nie tworzył gradientu wiarygodnej informacji o niebezpieczeństwie. W drugim układzie (*Materiał i metody*, II.2.3.3) zastosowanie pęcherzyka powietrza, wpuszczanego do środkowego sektora każdej z kolumn dla stworzenia

oddzielnej cyrkulacji medium w górnej i dolnej części każdej z kolumn (i tym samym dla stworzenia stabilnego pionowego gradientu pokarmu w każdej z nich), wpływało istotnie na rozmieszczenie *Daphnia*, ponieważ osobniki unikały zbyt intensywnej turbulencji w górnej części kolumny. Dodatkowo, również i w drugim układzie, gradient informacji o niebezpieczeństwie mógł nie nieść ze sobą wiarygodnej informacji, ponieważ gradient spektrum światła nie odzwierciedlał wiernie gradientu spektrum światła słonecznego.

Przed przystąpieniem do eksperymentów we właściwej (trzeciej) wersji układu, we wstępnych testach, ustalony został przebieg gradientu pokarmu, jak również przebieg gradientu natężenia i spektrum światła, które odzwierciedlały w skali 1:15 przebieg tych gradientów w jeziorze Roś we wrześniu 2012 roku (Rys. 2, *Materiał i metody*, II.2.1, gradienty w 1 metrowej kolumnie układu odpowiadały gradientom w 15 metrowym słupie wody w jeziorze). Odpowiedni (i taki sam w każdym eksperymencie) kształt gradientu pokarmu glonowego oraz odpowiednie jego stężenie na każdej głębokości otrzymane zostały drogą prób i błędów poprzez ustalenie prędkości dopływu świeżego medium do każdego sektora każdej z kolumn (*Materiał i metody*, II.2.3.4), jak również poprzez ustalenie stężenia pokarmu w poszczególnych zbiornikach, z których systemem wężyków dozowane były media do poszczególnych sektorów (Rys. 9). Gradient światła ustawiony został wcześniej, w trakcie konstruowania właściwej wersji układu (*Materiał i metody*, II.2.3.4).

We właściwej (trzeciej) wersji układu przeprowadzone zostały trzy typy eksperymentów, które pośrednio lub bezpośrednio posłużyły dla weryfikacji prognoz modelowych: **po pierwsze**, eksperymenty dla zbadania wpływu kierunkowego przepływu medium (od dołu ku górze) na rozmieszczenie *Daphnia* (Tabela 7), **po drugie**, eksperymenty dla wyznaczenia pionowego rozmieszczenia *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji, każdego w jednym z 4 wariantów eksperymentalnych (w nieobecności któregośkolwiek gradientu, w obecności jedynie gradientu pokarmu, w obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie i w obu nakładających się tych gradientach (Tabela 8a i 8b), i **po trzecie**, eksperymenty dla zbadania wyboru głębokości przez pojedynczego osobnika, również każdego w jednym z 4 wariantów eksperymentalnych (Tabela 9a-9c). Pomimo tego, że „eksperymenty dla zbadania wpływu kierunkowego przepływu mediów na rozmieszczenie *Daphnia*” nie zostały wykorzystane bezpośrednio dla weryfikacji prognoz modelowych, pozwoliły na sprawdzenie, czy kierunkowy przepływ medium nie wpłynie istotnie na rozmieszczenie *Daphnia* we właściwych eksperymentach dla tej weryfikacji, a także pozwoliły na oszacowanie czasu trwania tych eksperymentów. Podstawowy materiał dla weryfikacji prognoz modelowych został zebrany na podstawie danych z „Eksperymentów dla

wyznaczenia pionowego rozmieszczenia *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji”. Natomiast, dane z „eksperymentów dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki” zostały wykorzystane nie tylko dla zweryfikowania prognoz modelowych, ale również dla zbadania zróżnicowania międzyosobniczego w wyborze głębokości w różnych wariantach dla obydwu klas wiekowych.

#### **II.2.5.2. Eksperymenty dla zbadania wpływu kierunkowego przepływu mediów na rozmieszczenie *Daphnia***

Dla zbadania wpływu turbulencji wody w układzie eksperymentalnym, generowanej przez obydwie obiegi (duży – wzdłuż całej kolumny i mały – wewnątrz każdego sektora, *Materiał i metody*, II.2.3.4, Rys. 9), niezbędne dla utrzymywania stabilnego gradientu pokarmu w trakcie eksperymentu, na rozmieszczenie *Daphnia*, przeprowadzono 16 eksperymentów (Tabela 7), po osiem dla osobników młodocianych (2,5 dniowych) i dla osobników dojrzałych (5,5 dniowych). Dla osobników z każdej klasy wiekowej przeprowadzono po 4 eksperymenty w obecności i w nieobecności przepływu. Zarówno w obecności, jak i w nieobecności przepływu dla osobników z każdej klasy wiekowej przeprowadzono po 2 eksperymenty w wysokim i w niskim zagęszczeniu populacji *Daphnia* (Tabela 7).

Procedura w każdym eksperymencie była podobna. Obie kolumny były napełniane medium eksperymentalnym (wodą jeziorną, filtrowaną przez filtry o porach 0,2  $\mu\text{m}$  bez dodatku pokarmu glonowego). Dodatkowo, w wariacie z przepływem, medium wlewane było również do zbiorników, z których w trakcie eksperymentu dozowane było systemem wężyków do każdego sektora obydwu kolumn. Gaszone było światło w pomieszczeniu laboratoryjnym. Posługując się noktowizorem binokularowym, umożliwiającym widzenie w niemal całkowitej ciemności, wprowadzana była od góry każdej z kolumn, w szklanym naczyniu z filtrowaną wodą, określona (wcześniej policzona) liczba osobników *Daphnia* wprowadzane były do 5 od góry sektora (za pomocą rurki gumowej rozpoczynającej się lejkiem). Następnie do wnętrza każdej z kolumn wkładana była od góry ramka z siatką planktonową (tworząc górną granicę górnego sektora) tak, aby odizolować dziesięciosektorową kolumnę z wodą, w której przebywały *Daphnia*, od odpływu zlokalizowanego tuż nad górną granicą górnego sektora (Rys. 9). Dla ujednolicenia procedury, czynność ta wykonywana była nie tylko w wariacie z przepływem, ale również w wariacie bez przepływu. W wariacie z przepływem, tuż po wprowadzeniu zwierząt do kolumn, włączana była pompa przepływowa i obiegowa (*Materiał i metody*, II.2.3.4, Rys. 9). Każdy eksperyment trwał 180 minut, w czasie których monitorowane było rozmieszczenie

*Daphnia* co 30 minut (Rys. 20). Dzięki temu w eksperymentach tych było możliwe zbadanie nie tylko różnic w rozmieszczeniu *Daphnia* w obecności i w nieobecności przepływu, ale również wyznaczenie czasu niezbędnego dla ustalenia się równowagi w rozmieszczeniu zarówno osobników młodych, jak i dojrzałych w wariancie z przepływem.

**Tabela 7.** Charakterystyka 16 eksperymentów dla zbadania wpływu kierunkowego przepływu mediów na rozmieszczenie *Daphnia* we właściwej (trzeciej) wersji układu eksperymentalnego dla badania rozmieszczenia zooplanktonu (*Materiał i metody, II.2.3.4*), w których osobniki młode lub dojrzałe przebywały w jednej z kolumn (L lub P) w niskim lub w wysokim zagęszczeniu populacji (w zakresie odpowiednio, 3,17-10,44 lub 39,39-63,72 osobn.  $\times L^{-1}$ ) w nieobecności (Brak) lub w obecności (Przepływ) przepływu. Eksperymenty w kolumnie L lub w kolumnie P wymienione są w tabeli jako równorzędne powtórzenia, jednak w analizie statystycznej różnic między wariantami (w obecności i w nieobecności przepływu) kolumna została uwzględniona jako zmienna zależna

Numer eksperymentu	Data	Kolumna	Zagęszczenie (osobn. $\times L^{-1}$ )	Wiek <i>Daphnia</i>	Wariant eksperymentu
E1	11.08.2014	L	7,11	Dojrzałe	Brak
E2	11.08.2014	P	47,94	Dojrzałe	Brak
E3	12.08.2014	L	49,50	Młode	Brak
E4	12.08.2014	P	6,06	Młode	Brak
E5	13.08.2014	L	4,67	Dojrzałe	Brak
E6	13.08.2014	P	39,39	Dojrzałe	Brak
E7	14.08.2014	L	42,01	Młode	Brak
E8	14.08.2014	P	3,17	Młode	Brak
E9	24.08.2014	L	7,33	Dojrzałe	Przepływ
E10	24.08.2014	P	56,33	Dojrzałe	Przepływ
E11	25.08.2014	L	48,52	Młode	Przepływ
E12	25.08.2014	P	7,00	Młode	Przepływ
E13	26.08.2014	L	63,72	Dojrzałe	Przepływ
E14	26.08.2014	P	5,89	Dojrzałe	Przepływ
E15	28.08.2014	L	10,44	Młode	Przepływ
E16	28.08.2014	P	43,22	Młode	Przepływ

### II.2.5.3. Eksperymenty dla wyznaczenia pionowego rozmieszczenia *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji

Dla wyznaczenia pionowego rozmieszczenia *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji przeprowadzono 66 eksperymentów, w każdym z nich w jednej z dwóch kolumn (L lub P) trzeciej (właściwej) wersji układu eksperymentalnego (*Materiał i metody, II.2.3.4*) w jednym z 4 wariantów eksperymentalnych. W nieobecności któregośkolwiek gradientu przeprowadzone zostało 16 eksperymentów (po 8 dla młodych i dojrzałych *Daphnia*), w samym gradiencie pokarmu również 16 eksperymentów (po 8 dla młodych i dojrzałych *Daphnia*), w samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy 15 eksperymentów (8 dla młodych i 7 dla dojrzałych), i w obydwu nakładających się na siebie

gradientach 19 eksperymentów (10 dla młodych i 9 dla dojrzałych osobników, Tabela 8a i 8b). Eksperymenty przeprowadzone zostały w różnych zagęszczeniach (między 3 i 60 osobn.  $\times L^{-1}$ ) tak, aby możliwe było uchwycenie ewentualnej nieliniowej zależności między średnią głębokością wybieraną przez *Daphnia* i zagęszczeniem ich populacji w każdym z 4 wariantów eksperymentalnych (Tabela 8a i 8b).

Każdy eksperyment trwał 6 godzin, ale *Daphnia* przebywały w jednym z czterech wariantów jedynie przez ostatnie dwie godziny (między 4 i 6 godziną), natomiast podczas pierwszych 4 godzin każdego eksperymentu, *Daphnia* były aklimowane do warunków odpowiadających właściwemu wariantowi tak, że przebywały przez pierwsze 2 godziny w nieobecności któregośkolwiek gradientu i przez kolejne 2 godziny (między 2 i 4 godziną każdego eksperymentu) w warunkach stopniowo dostosowywanych do warunków w wariacie eksperymentalnym (albo nadal w nieobecności któregośkolwiek gradientu, albo w stopniowo kształtujących się gradientach). Wobec tego, procedura na początku eksperymentu była taka sama, jak w wariacie z przepływem w „eksperymentach dla zbadania wpływu kierunkowego przepływu mediów na rozmieszczenie *Daphnia*”. Przed rozpoczęciem eksperymentu, obie kolumny, jak również zbiorniki, z których pobierane były świeże media w trakcie eksperymentu, napełniane były filtrowaną wodą jeziorną nie zawierającą pokarmu glonowego z tym, że do zbiorników wprowadzana była tylko taka ilość medium, która starczała na pierwsze dwie godziny eksperymentu. Gaszone było światło w pomieszczeniu laboratoryjnym. Posługując się noktowizorem binokularowym, umożliwiającym widzenie w samym świetle podczerwonym, wprowadzana była od góry każdej z kolumn, w szklanym naczyniu z filtrowaną wodą, określona (wcześniej policzona) liczba osobników. *Daphnia* wprowadzane były do 5 (środkowego) sektora (za pomocą rurki gumowej rozpoczynającej się lejkiem). Następnie do wnętrza każdej z kolumn wkładana była od góry ramka z siatką planktonową (Rys. 9) i włączane były obie pompy perystaltyczne odpowiedzialne za mały i duży obieg medium w kolumnach. W eksperymentach w samym gradiencie światła lub w obydwu nakładających się na siebie gradientach, programowane były zmiany natężenia światła tak, że gradient światła pojawiał się w 120 minucie eksperymentu, następnie osiągał 50% maksymalnego natężenia na każdej głębokości w 180 minucie i 100% maksymalnego natężenia w 240 minucie eksperymentu. Gradient z maksymalnym natężeniem światła utrzymywany był przez ostatnie 120 minut eksperymentu (między 240 i 360 minutą eksperymentu). W eksperymentach w samym gradiencie pokarmu i w obu nakładających się na siebie gradientach, gradient pokarmu tworzony był między 120 i 150 minutą eksperymentu poprzez wprowadzenie (w 120 minucie) do zbiorników, z których dozowane było medium za

pomocą pompy perystaltycznej, świeżej porcji nafiltrowanej wody jeziornej z dodatkiem ustalonej we wstępnych testach ilości stężonych glonów *Acutodesmus* z hodowli (Rys. 9). W wariantach bez gradientu pokarmu wlewana była również świeża porcja wody do zbiorników, ale bez glonów.

W każdym eksperymencie rozmieszczenie *Daphnia* było monitorowane co 30 minut w trakcie pierwszych 4 godzin eksperymentu (podczas aklimacji) i co godzinę w trakcie ostatnich dwóch godzin w ustabilizowanych warunkach eksperymentalnych. W każdym eksperymencie z gradientem pokarmu wyliczane było stężenie pokarmu w każdym z 10 sektorów każdej z kolumn poprzez pobranie prób medium, odczyt fluorescencji za pomocą fluorometru (*TD-700*) i na koniec odczytanie stężenia pokarmu (mierzonego w  $\text{mg C} \times \text{L}^{-1}$ ) z krzywej kalibracyjnej obrazującej zależność fluorescencji od stężenia węgla wyznaczonego dla glonów *Acutodesmus*. Gradient natężenia i spektrum światła zmierzony został po zakończeniu 4 losowo wybranych eksperymentów (po 2 dla kolumny lewej i prawej) poprzez zmierzenie natężenia światła odpowiadającego trzem zakresom (barwom 360-530 nm - niebieskiemu; 530-660 nm - zielonemu i 660-880 nm – czerwonemu), których suma stanowiła całkowite natężenie światła ( $E$ ) w każdym sektorze (Rys. 22A), w każdym z 10 sektorów za pomocą przenośnego spektrofotometru *USB2000-UV-VIS* (Tabela 16). Przebieg gradientu spektrum wprowadzony został do sparametryzowanego wzoru 12 (*Materiał i metody, II.2.2*), co pozwoliło na policzenie ważnej w modelu odległości reakcji (dla obydwu klas wiekowych) na każdej głębokości we właściwej wersji układu eksperymentalnego (Rys. 22C).



**Tabela 8a.** Charakterystyka 36 spośród 66 finalnych eksperymentów (charakterystyka pozostałych 30 eksperymentów w Tabeli 8b) dla wyznaczenia pionowego rozmieszczenia *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji (eksperymenty dla weryfikacji prognoz modelowych, *Materiał i metody*, II.2.5.3), w których osobniki (młode lub dojrzałe) przebywały przez ostatnie dwie godziny w jednym z czterech właściwych wariantów eksperymentalnych: (1) zarówno w obecności gradientu pokarmu, jak i w obecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony ryby planktonożernej (F + P), (2) w obecności samego gradientu pokarmu (F), (3) w obecności samego gradientu informacji o niebezpieczeństwie (P) lub (4) w nieobecności któregośkolwiek gradientu (C), w jednej z dwóch kolumn (L lub P) trzeciej (właściwej) wersji układu eksperymentalnego (*Materiał i metody*, II.2.3.4)

Numer eksperymentu	Data	Kolumna	Zagęszczenie (osobn. $\times$ L <sup>-1</sup> )	Wiek <i>Daphnia</i>	Wariant eksperymentu
E1	07.09.2014	L	8,3	Dojrzałe	F
E2	07.09.2014	P	59,2	Dojrzałe	F
E3	08.09.2014	L	5,9	Młode	F
E4	08.09.2014	P	54,7	Młode	F
E5	09.09.2014	L	3,2	Dojrzałe	C
E6	09.09.2014	P	35,7	Dojrzałe	C
E7	10.09.2014	L	48,9	Młode	C
E8	10.09.2014	P	5,3	Młode	C
E9	13.09.2014	L	55,1	Dojrzałe	F + P
E10	13.09.2014	P	5,6	Dojrzałe	F + P
E11	31.10.2014	L	9,9	Dojrzałe	F + P
E12	31.10.2014	P	55,6	Dojrzałe	F + P
E13	01.11.2014	L	4,3	Młode	F + P
E14	01.11.2014	P	49,7	Młode	F + P
E15	02.11.2014	L	6,9	Młode	F + P
E16	02.11.2014	P	47,9	Młode	F + P
E17	03.11.2014	L	12,6	Młode	F + P
E18	03.11.2014	P	23,8	Młode	F + P
E19	04.11.2014	L	47,8	Dojrzałe	P
E20	04.11.2014	P	5,3	Dojrzałe	P
E21	05.11.2014	L	3,0	Dojrzałe	P
E22	05.11.2014	P	60,1	Dojrzałe	P
E23	06.11.2014	L	15,4	Młode	P
E24	06.11.2014	P	42,7	Młode	P
E25	11.12.2014	L	4,3	Młode	P
E26	11.12.2014	P	59,4	Młode	P
E27	12.12.2014	L	5,8	Młode	P
E28	12.12.2014	P	56,8	Młode	P
E29	13.12.2014	L	59,4	Dojrzałe	F
E30	13.12.2014	P	7,2	Dojrzałe	F
E31	14.12.2014	L	34,4	Dojrzałe	F
E32	14.12.2014	P	4,7	Dojrzałe	F
E33	15.12.2014	L	47,0	Młode	F
E34	15.12.2014	P	5,3	Młode	F
E35	16.12.2014	L	42,8	Dojrzałe	C
E36	16.12.2014	P	4,4	Dojrzałe	C

**Tabela 8b.** Charakterystyka pozostałych 30 finalnych eksperymentów (charakterystyka wcześniejszych 36 eksperymentów została zaprezentowana w Tabeli 8a) dla wyznaczenia pionowego rozmieszczenia *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji (eksperymenty przeprowadzone na grupie osobników dla weryfikacji prognoz modelowych, *Materiał i metody, II.2.5.3*)

Numer eksperymentu	Data	Kolumna	Zagęszczenie (osobn. $\times$ L <sup>-1</sup> )	Wiek <i>Daphnia</i>	Wariant eksperymentu
E37	18.12.2014	L	5,9	Młode	C
E38	18.12.2014	P	45,7	Młode	C
E39	19.12.2014	L	45,6	Dojrzałe	F + P
E40	19.12.2014	P	5,3	Dojrzałe	F + P
E41	28.01.2015	P	5,5	Młode	F + P
E42	28.01.2015	L	4,1	Młode	F + P
E43	29.01.2015	P	27,7	Dojrzałe	P
E44	29.01.2015	L	59,6	Dojrzałe	P
E45	01.02.2015	L	19,0	Młode	P
E46	01.02.2015	P	46,0	Młode	P
E47	02.02.2015	L	31,7	Dojrzałe	F
E48	02.02.2015	P	33,8	Dojrzałe	F
E49	03.02.2015	L	6,2	Młode	F
E50	03.02.2015	P	15,3	Młode	F
E51	04.02.2015	L	39,2	Dojrzałe	C
E52	04.02.2015	P	6,1	Dojrzałe	C
E53	05.02.2015	L	5,6	Młode	C
E54	05.02.2015	P	39,1	Młode	C
E55	09.02.2015	L	6,8	Dojrzałe	F + P
E56	09.02.2015	L	57,0	Dojrzałe	F + P
E57	10.02.2015	P	59,1	Młode	F + P
E58	10.02.2015	L	59,9	Młode	F + P
E59	11.02.2015	L	11,8	Młode	F
E60	11.02.2015	P	4,3	Młode	F
E61	12.02.2015	L	58,1	Dojrzałe	C
E62	12.02.2015	P	20,3	Dojrzałe	C
E63	16.02.2015	L	56,2	Młode	C
E64	16.02.2015	P	3,9	Młode	C
E65	17.02.2015	P	24,5	Dojrzałe	F + P
E66	18.02.2015	P	26,1	Dojrzałe	P

#### II.2.5.4. Eksperymenty dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki

Dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze *Daphnia* przeprowadzono 262 eksperymenty (Tabela 9a – 9c), w każdym z nich w jednej z dwóch kolumn (L lub P) trzeciej (właściwej) wersji układu eksperymentalnego (*Materiał i metody, II.2.3.4*) w jednym z 4 wariantów eksperymentalnych. W nieobecności któregośkolwiek gradientu przeprowadzone zostały 64 eksperymenty (po 32 dla młodych i dojrzałych *Daphnia*), w samym gradiencie pokarmu 68 eksperymentów (32 dla młodych i 36 dla dojrzałych), w samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy 66 eksperymentów (po 33 dla młodych i

dla dojrzałych), i w obydwu nakładających się na siebie gradientach 64 eksperymenty (po 32 dla młodych i dla dojrzałych, Tabela 9a – 9c).

Procedury wprowadzania zwierząt eksperymentalnych do układu, przygotowywania medium oraz tworzenia gradientów podczas każdego eksperymentu były identyczne do procedur w eksperymentach przeprowadzanych dla grupy osobników (*Materiał i metody*, II.2.5.3). Różnił się natomiast czas trwania eksperymentów. Każdy eksperyment trwał 260 minut, przez pierwsze 240 minut osobnik był aklimowany do warunków odpowiadających jednemu z 4 wariantów w taki sposób, że przez pierwsze 120 minut przebywał w nieobecności któregośkolwiek gradientu, a następnie przez kolejne 120 minut w warunkach stopniowo dostosowywanych do warunków w wariancie eksperymentalnym (albo nadal w nieobecności któregośkolwiek gradientu, albo w stopniowo wprowadzanych gradientach). Podczas ostatnich 22 minut eksperymentu, w stabilnych warunkach dla danego wariantu eksperymentalnego, przeprowadzany był odczyt głębokości (z dokładnością do numeru sektora) wybieranych przez osobnika w interwałach co 0,5 minuty (łącznie 44 odczyty).

**Tabela 9a.** Charakterystyka 72 spośród 262 eksperymentów (charakterystyka pozostałych eksperymentów w Tabelach 9b i 9c) przeprowadzonych dla zbadania wyboru głębokości przez osobniki (*Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9), przebywające pojedynczo w jednej z kolumn (L lub P) właściwej (trzeciej) wersji układu eksperymentalnego dla badania rozmieszczenia zooplanktonu (*Materiał i metody*, II.2.3.4), w których każdy osobnik (młody lub dojrzały) przebywał w jednym z 4 wariantów eksperymentalnych: (1) zarówno w obecności gradientu pokarmu, jak i w obecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony ryby planktonożerne (F + P), (2) w obecności samego gradientu pokarmu (F), (3) w obecności samego gradientu informacji o niebezpieczeństwie (P) lub (4) w nieobecności któregośkolwiek gradientu (C)

Numer Eksp.	Data	Kolumna	Wiek <i>Daphnia</i>	Wariant	Numer Eksp.	Data	Kolumna	Wiek <i>Daphnia</i>	Wariant
E1	08.06.2014	L	Dojrzałe	C	E37	21.06.2014	L	Dojrzał	C
E2	08.06.2014	P	Dojrzałe	C	E38	21.06.2014	P	Dojrzał	C
E3	08.06.2014	L	Dojrzałe	C	E39	24.06.2014	L	Dojrzał	F
E4	08.06.2014	P	Młode	C	E40	24.06.2014	P	Dojrzał	F
E5	09.06.2014	L	Dojrzałe	C	E41	24.06.2014	L	Dojrzał	F
E6	09.06.2014	P	Dojrzałe	C	E42	24.06.2014	P	Dojrzał	F
E7	09.06.2014	L	Dojrzałe	C	E43	25.06.2014	L	Dojrzał	F
E8	09.06.2014	P	Dojrzałe	C	E44	25.06.2014	P	Dojrzał	F
E9	10.06.2014	L	Dojrzałe	F	E45	25.06.2014	L	Dojrzał	F
E10	10.06.2014	P	Dojrzałe	F	E46	25.06.2014	P	Dojrzał	F
E11	10.06.2014	L	Dojrzałe	F	E47	26.06.2014	L	Dojrzał	F
E12	10.06.2014	P	Dojrzałe	F	E48	26.06.2014	P	Dojrzał	F
E13	11.06.2014	L	Dojrzałe	F + P	E49	26.06.2014	L	Dojrzał	F
E14	11.06.2014	P	Dojrzałe	F + P	E50	26.06.2014	P	Dojrzał	F
E15	11.06.2014	P	Dojrzałe	F + P	E51	27.06.2014	L	Dojrzał	F + P
E16	13.06.2014	P	Dojrzałe	C	E52	27.06.2014	P	Dojrzał	F + P
E17	13.06.2014	L	Dojrzałe	C	E53	27.06.2014	L	Dojrzał	F + P
E18	13.06.2014	P	Dojrzałe	C	E54	27.06.2014	P	Dojrzał	F + P
E19	13.06.2014	L	Dojrzałe	C	E55	28.06.2014	L	Dojrzał	F + P
E20	14.06.2014	P	Dojrzałe	F	E56	28.06.2014	P	Dojrzał	F + P
E21	14.06.2014	L	Dojrzałe	F	E57	28.06.2014	L	Młode	F + P
E22	14.06.2014	P	Dojrzałe	F	E58	28.06.2014	P	Młode	F + P
E23	14.06.2014	L	Dojrzałe	F	E59	29.06.2014	L	Młode	F + P
E24	15.06.2014	P	Dojrzałe	F	E60	29.06.2014	P	Młode	F + P
E25	15.06.2014	L	Dojrzałe	F	E61	01.07.2014	L	Dojrzał	C
E26	17.06.2014	P	Dojrzałe	F + P	E62	01.07.2014	P	Dojrzał	C
E27	17.06.2014	L	Dojrzałe	F + P	E63	01.07.2014	L	Dojrzał	C
E28	17.06.2014	P	Dojrzałe	F + P	E64	01.07.2014	P	Dojrzał	C
E29	17.06.2014	L	Dojrzałe	F + P	E65	02.07.2014	L	Dojrzał	C
E30	18.06.2014	P	Dojrzałe	F + P	E66	02.07.2014	P	Dojrzał	C
E31	18.06.2014	L	Dojrzałe	F + P	E67	02.07.2014	L	Dojrzał	C
E32	19.06.2014	P	Dojrzałe	C	E68	02.07.2014	P	Dojrzał	C
E33	19.06.2014	L	Dojrzałe	C	E69	03.07.2014	L	Dojrzał	C
E34	19.06.2014	P	Dojrzałe	C	E70	03.07.2014	L	Młode	C
E35	19.06.2014	L	Dojrzałe	C	E71	03.07.2014	P	Młode	C
E36	20.06.2014	L	Dojrzałe	C	E72	04.07.2014	L	Młode	C

**Tabela 9b.** Charakterystyka 96 spośród 262 eksperymentów (od E73 do E168, charakterystyka pozostałych eksperymentów w Tabelach 9a i 9c) przeprowadzonych dla zbadania wyboru głębokości przez osobniki młode lub dorosłe (*Materiał i metody, II.2.5.4, Tabela 9*), przebywające pojedynczo w jednej z kolumn (L lub P) właściwej (trzeciej) wersji układu eksperymentalnego (*Materiał i metody, II.2.3.4*) w jednym z 4 wariantów eksperymentalnych

Numer eksp.	Data	Kolumna	Wiek <i>Daphnia</i>	Wariant eksp.	Numer eksp.	Data	Kolumna	Wiek <i>Daphnia</i>	Wariant eksp.
E73	04.07.2014	P	Młode	C	E121	25.07.2014	P	Dojrzał	P
E74	04.07.2014	L	Młode	C	E122	25.07.2014	L	Dojrzał	P
E75	04.07.2014	P	Młode	C	E123	25.07.2014	P	Dojrzał	P
E76	05.07.2014	L	Młode	C	E124	26.07.2014	L	Dojrzał	P
E77	05.07.2014	P	Młode	C	E125	26.07.2014	P	Młode	P
E78	05.07.2014	L	Młode	C	E126	26.07.2014	L	Młode	P
E79	05.07.2014	P	Młode	C	E127	26.07.2014	P	Młode	P
E80	11.07.2014	L	Młode	F	E128	27.07.2014	L	Młode	P
E81	11.07.2014	P	Młode	F	E129	27.07.2014	P	Młode	P
E82	11.07.2014	L	Młode	F	E130	27.07.2014	L	Młode	P
E83	11.07.2014	P	Młode	F	E131	27.07.2014	P	Młode	P
E84	12.07.2014	P	Młode	F	E132	28.07.2014	L	Młode	P
E85	12.07.2014	L	Młode	F	E133	28.07.2014	P	Młode	P
E86	12.07.2014	P	Młode	F	E134	28.07.2014	L	Młode	P
E87	14.07.2014	L	Dojrzał	F + P	E135	28.07.2014	P	Młode	P
E88	14.07.2014	P	Dojrzał	F + P	E136	29.07.2014	L	Młode	P
E89	14.07.2014	L	Dojrzał	F + P	E137	29.07.2014	P	Młode	P
E90	14.07.2014	P	Dojrzał	F + P	E138	06.08.2014	L	Dojrzał	C
E91	15.07.2014	L	Dojrzał	F + P	E139	06.08.2014	P	Młode	C
E92	15.07.2014	P	Dojrzał	F + P	E140	06.08.2014	L	Młode	C
E93	15.07.2014	L	Młode	F + P	E141	06.08.2014	P	Młode	C
E94	15.07.2014	P	Młode	F + P	E142	07.08.2014	L	Młode	C
E95	16.07.2014	L	Młode	F + P	E143	07.08.2014	P	Młode	C
E96	16.07.2014	P	Młode	F + P	E144	07.08.2014	L	Młode	C
E97	16.07.2014	L	Młode	F + P	E145	07.08.2014	P	Młode	C
E98	16.07.2014	P	Młode	F + P	E146	08.08.2014	L	Młode	C
E99	17.07.2014	L	Młode	F + P	E147	08.08.2014	P	Młode	C
E100	17.07.2014	P	Młode	F + P	E148	08.08.2014	L	Młode	C
E101	20.07.2014	L	Dojrzał	P	E149	08.08.2014	P	Młode	C
E102	20.07.2014	P	Dojrzał	P	E150	20.09.2014	L	Dojrzał	C
E103	20.07.2014	L	Dojrzał	P	E151	20.09.2014	P	Dojrzał	C
E104	20.07.2014	P	Dojrzał	P	E152	20.09.2014	L	Dojrzał	C
E105	21.07.2014	L	Dojrzał	P	E153	20.09.2014	P	Dojrzał	C
E106	21.07.2014	P	Dojrzał	P	E154	21.09.2014	L	Młode	C
E107	21.07.2014	L	Dojrzał	P	E155	21.09.2014	P	Młode	C
E108	21.07.2014	P	Dojrzał	P	E156	21.09.2014	L	Młode	C
E109	22.07.2014	L	Dojrzał	P	E157	21.09.2014	P	Młode	C
E110	22.07.2014	P	Dojrzał	P	E158	22.09.2014	L	Młode	C
E111	22.07.2014	L	Dojrzał	P	E159	22.09.2014	P	Młode	C
E112	22.07.2014	P	Dojrzał	P	E160	22.09.2014	L	Młode	C
E113	23.07.2014	L	Dojrzał	P	E161	22.09.2014	P	Młode	C
E114	23.07.2014	P	Dojrzał	P	E162	23.09.2014	L	Młode	C
E115	23.07.2014	L	Dojrzał	P	E163	23.09.2014	P	Młode	C
E116	24.07.2014	L	Dojrzał	P	E164	25.09.2014	L	Dojrzał	F
E117	24.07.2014	P	Dojrzał	P	E165	25.09.2014	P	Dojrzał	F
E118	24.07.2014	L	Dojrzał	P	E166	25.09.2014	L	Dojrzał	F
E119	24.07.2014	P	Dojrzał	P	E167	25.09.2014	P	Młode	F
E120	25.07.2014	L	Dojrzał	P	E168	26.09.2014	L	Młode	F

**Tabela 9c.** Charakterystyka 94 spośród 262 eksperymentów (od E169 do E262, charakterystyka pozostałych eksperymentów w Tabelach 9a i 9b) przeprowadzonych dla zbadania wyboru głębokości przez osobniki młode lub dorosłe (*Materiał i metody, II.2.5.4, Tabela 9*), przebywające pojedynczo w jednej z kolumn (L lub P) właściwej (trzeciej) wersji układu eksperymentalnego (*Materiał i metody, II.2.3.4*) w jednym z 4 wariantów eksperymentalnych

Numer eksp.	Data	Kolumna	Wiek <i>Daphnia</i>	Wariant eksp.	Numer eksp.	Data	Kolumna	Wiek <i>Daphnia</i>	Wariant eksp.
E169	26.09.2014	P	Młode	F	E217	19.10.2014	P	Młode	P
E170	26.09.2014	L	Młode	F	E218	19.10.2014	L	Młode	P
E171	26.09.2014	P	Młode	F	E219	19.10.2014	P	Młode	P
E172	27.09.2014	L	Młode	F	E220	20.10.2014	L	Młode	P
E173	27.09.2014	P	Młode	F	E221	20.10.2014	P	Młode	P
E174	27.09.2014	L	Młode	F	E222	20.10.2014	L	Młode	P
E175	27.09.2014	P	Młode	F	E223	20.10.2014	P	Młode	P
E176	28.09.2014	L	Dojrzał	F	E224	21.10.2014	L	Młode	P
E177	28.09.2014	L	Dojrzał	F	E225	21.10.2014	P	Młode	P
E178	28.09.2014	P	Dojrzał	F	E226	21.10.2014	L	Młode	P
E179	28.09.2014	L	Dojrzał	F	E227	21.10.2014	P	Młode	P
E180	29.09.2014	L	Młode	F	E228	22.10.2014	L	Młode	P
E181	29.09.2014	P	Młode	F	E229	22.10.2014	P	Młode	P
E182	29.09.2014	L	Młode	F	E230	22.10.2014	L	Młode	P
E183	29.09.2014	P	Młode	F	E231	24.10.2014	L	Młode	F
E184	30.09.2014	L	Młode	F	E232	24.10.2014	P	Młode	F
E185	08.10.2014	L	Młode	F	E233	25.10.2014	L	Młode	F
E186	08.10.2014	P	Młode	F	E234	25.10.2014	P	Młode	F
E187	08.10.2014	L	Młode	F	E235	25.10.2014	L	Młode	F
E188	08.10.2014	P	Młode	F	E236	25.10.2014	P	Młode	F
E189	12.10.2014	L	Dojrzał	F + P	E237	26.10.2014	L	Młode	F
E190	12.10.2014	P	Dojrzał	F + P	E238	26.10.2014	P	Dojrzał	F
E191	12.10.2014	L	Dojrzał	F + P	E239	26.10.2014	L	Dojrzał	F
E192	12.10.2014	P	Dojrzał	F + P	E240	26.10.2014	P	Dojrzał	F
E193	13.10.2014	L	Dojrzał	F + P	E241	27.10.2014	L	Dojrzał	F
E194	13.10.2014	P	Młode	F + P	E242	27.10.2014	P	Dojrzał	F
E195	13.10.2014	L	Młode	F + P	E243	27.10.2014	L	Dojrzał	F
E196	13.10.2014	P	Młode	F + P	E244	27.10.2014	P	Dojrzał	F
E197	14.10.2014	L	Młode	F + P	E245	28.10.2014	L	Młode	F + P
E198	14.10.2014	P	Młode	F + P	E246	28.10.2014	P	Młode	F + P
E199	14.10.2014	L	Młode	F + P	E247	28.10.2014	L	Młode	F + P
E200	14.10.2014	P	Młode	F + P	E248	28.10.2014	P	Młode	F + P
E201	15.10.2014	L	Młode	F + P	E249	07.11.2014	L	Młode	F + P
E202	15.10.2014	P	Młode	F + P	E250	07.11.2014	P	Młode	F + P
E203	15.10.2014	L	Młode	F + P	E251	07.11.2014	L	Młode	F + P
E204	16.10.2014	L	Dojrzał	P	E252	07.11.2014	P	Młode	F + P
E205	16.10.2014	P	Dojrzał	P	E253	08.11.2014	L	Młode	F + P
E206	16.10.2014	L	Dojrzał	P	E254	08.11.2014	P	Młode	F + P
E207	16.10.2014	P	Dojrzał	P	E255	08.11.2014	L	Dojrzał	F + P
E208	17.10.2014	L	Dojrzał	P	E256	08.11.2014	P	Dojrzał	F + P
E209	17.10.2014	P	Dojrzał	P	E257	09.11.2014	L	Dojrzał	F + P
E210	17.10.2014	L	Dojrzał	P	E258	09.11.2014	P	Dojrzał	F + P
E211	17.10.2014	P	Młode	P	E259	09.11.2014	L	Dojrzał	F + P
E212	18.10.2014	L	Młode	P	E260	09.11.2014	P	Dojrzał	F + P
E213	18.10.2014	P	Młode	P	E261	10.11.2014	L	Dojrzał	P
E214	18.10.2014	L	Młode	P	E262	10.11.2014	P	Dojrzał	P
E215	18.10.2014	P	Młode	P					
E216	19.10.2014	L	Młode	P					

### II.2.6. Symulacje z wykorzystaniem NetLogo

Ze względu na to, że warunki stworzone w modelu symulacyjnym jest trudniej odzwierciedlić w eksperymentach rzeczywistych, niż odwrotnie, najpierw zostały przeprowadzone eksperymenty rzeczywiste, a dopiero w drugiej kolejności zostały przeprowadzone eksperymenty wirtualne.

Przeprowadzone zostały 4 serie eksperymentów wirtualnych po 74 eksperymenty, każdy przeprowadzony w pojedynczej kolumnie podzielonej na 10 sektorów. W każdej serii, 8 eksperymentów przeprowadzone zostało dla pojedynczych osobników (4 warianty będące wynikiem kombinacji gradientu pokarmu i gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy  $\times$  2 klasy wiekowe), wybierających jedną głębokość, z tym, że każdy z eksperymentów powtórzony był 100 razy, co dawało uśredniony rozkład dla 100 osobników. Pozostałe 66 eksperymentów (16 w nieobecności któregośkolwiek gradientu, 16 w samym gradiencie pokarmu, 15 w samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie i 19 w obydwu gradientach) przeprowadzone zostało w różnych zagęszczeniach populacji *Daphnia*, które odpowiadały ich zagęszczeniom w eksperymentach rzeczywistych przeprowadzonych dla wyznaczenia pionowego rozmieszczenia *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji (*Materiał i metody*, II.2.5.3, Tabela 8a i 8b). Również pozostałe warunki w każdym z nich (klasa wiekowa *Daphnia*, gradient stężenia pokarmu, gradient natężenia i spektrum światła) odpowiadały warunkom w odpowiadającym mu eksperymencie rzeczywistym. Rozkład w każdym eksperymencie był uśredniony dla 100 symulacji (powtórzeń). Eksperyment rozpoczynał się od wprowadzenia zwierząt do środkowego sektora tak samo, jak w eksperymentach rzeczywistych, a kończył się po upływie 200 kroków czasowych, ale do dalszych analiz użyto tylko rozmieszczeń z ostatnich 100 kroków czasowych. Wyniki z pierwszych 100 kroków czasowych odrzucono, aby upewnić się, że mierzone rozmieszczenia dotyczą stanu równowagi, a nie stanów pośrednich, nim równowaga została osiągnięta. Postąpiono tak, ponieważ model dobrze odzwierciedlał proces ustalania się równowagowego rozmieszczenia (bo nie to było celem skonstruowania modelu), a raczej pokazywał, jakie powinno być rozmieszczenie *Daphnia* przy założeniu, że poruszają się tak, aby optymalizować swoje decyzje. Pojedynczy krok czasowy w symulacji odpowiadał mniej więcej czasowi, jaki rzeczywista *Daphnia* potrzebowała na przepłynięcie pomiędzy 2 sąsiednimi sektorami układu.

Każdy ze wspomnianych 74 eksperymentów powtórzono 4 razy, dla następujących kombinacji dwóch założeń: **po pierwsze**, że ryzyko śmierci *per capita* ze strony drapieżcy w różnych zagęszczeniach populacji *Daphnia* jest zgodne z przebiegiem II lub III typu

odpowiedzi funkcjonalnej Hollinga (Holling 1959), **po drugie**, że *Daphnia* wirtualne albo bezbłędnie odnajdują sektor (tj. głębokość), w którym mogą maksymalizować swoje dostosowanie, albo ich decyzje obarczone są błędem w wyniku błędnego oszacowania stężenia pokarmu (a tym samym tempa wzrostu) lub/i natężenia światła (a tym samym ryzyka śmierci) na różnych głębokościach. Wobec tego, że w ciemności odpowiedź funkcjonalna nie miała znaczenia, w samym gradiencie pokarmu przeprowadzone zostały dwa typy symulacji (z błędem i bez błędu w szacowaniu stężenia pokarmu, każdy powtórzony 2 razy). Ze względu na to, że w nieobecności któregośkolwiek gradientu ani kształt odpowiedzi funkcjonalnej, ani błąd w szacowaniu stężenia pokarmu i natężenia światła nie miał wpływu na wirtualne osobniki, dla wariantu tego został przeprowadzony tylko 1 typ symulacji (powtórzony 4 razy). Natomiast w samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie przeprowadzone zostały 4 typy symulacji (przy założeniu II lub III typu odpowiedzi funkcjonalnej × błędne lub bezbłędne szacowanie natężenia światła). Również w obecności obydwu gradientów przeprowadzone zostały 4 typy symulacji (przy założeniu II lub III typu odpowiedzi funkcjonalnej × błędne lub bezbłędne szacowanie natężenia światła i stężenia pokarmu).

## II.2.7. Analiza statystyczna danych

Dla zbadania wpływu stężenia pokarmu, zagęszczenia populacji *Daphnia*, natężenia światła, wieku *Daphnia* oraz interakcji między wiekiem *Daphnia* i pozostałymi zmiennymi na indywidualne tempo jej wzrostu, zastosowano metodę regresji nieliniowej. Założono przy tym, że tempo wzrostu zależy w sposób wykładniczy od stężenia pokarmu i liniowy od pozostałych zmiennych oraz uwzględniono interakcje wszystkich zmiennych z wiekiem, więc do dalszych dopasowań użyto wzoru (18):

$$Gr = (a_1' \times e^{F_{conc} \times a_2'}) + (b' \times D_D) + (c' \times L_{int}) + (f' - (2 \times a_1')) + (o' \times e^{F_{conc} \times a_2'} \times A) + (a_1' \times e^{F_{conc} \times r' \times A}) + (s' \times D_D \times A) + (u' \times L_{int} \times A) + ((z' - o') \times A) \quad (18)$$

gdzie,  $Gr$  – indywidualne tempo wzrostu (dzień<sup>-1</sup>),  $F_{conc}$  – stężenie pokarmu (mg C × L<sup>-1</sup>),  $D_D$  - zagęszczenie *Daphnia* (osobn. × L<sup>-1</sup>),  $L_{int}$  - natężenie światła (μm × m<sup>-2</sup> × s<sup>-1</sup>),  $A$  – wiek *Daphnia* ( $A$  jest zmienną zerojedykową; ang. *dummy variable*; której przyporządkowano wartość 0 dla młodych i wartość 1 dla dojrzałych osobników) oraz  $a_1'$ ,  $a_2'$ ,  $b'$ ,  $c'$ ,  $f'$ ,  $o'$ ,  $r'$ ,  $s'$ ,  $u'$ ,  $z'$  to parametry. We wzorze zostały wprowadzone dwa dodatkowe wyrazy:  $- 2 \times a_1'$  oraz  $-$



$o' \times A$ , które spowodowały „wyrównanie” trzech wyrazów wykładniczych ( $a_1' \times e^{F_{conc} \times a_2'}$ ,  $o' \times e^{F_{conc} \times a_2'} \times A$  oraz  $a_1' \times e^{F_{conc} \times r' \times A}$ ). Dzięki temu „wyrównaniu” parametr  $f'$  jest wartością tempa wzrostu, gdy wszystkie zmienne i interakcje są równe 0 (ang. *intercept* w regresji liniowej), a parametr  $z$  jako zależność od wieku (gdy wszystkie pozostałe zmienne, a więc i interakcje są równe 0). We wzorze uwzględniono jedynie interakcje wieku z pozostałymi zmiennymi tak, aby uniknąć silnego obniżenia mocy testu przy porównywaniu istotności interakcji każdej zmiennej z każdą, a także dlatego, że spodziewano się, że wiek *Daphnia* może wpływać na jej reakcje na bodźce środowiskowe. Po ustaleniu wzoru, oszacowano wartość parametrów w tym wzorze stosując nieliniową metodę najmniejszych kwadratów (ang. *Nonlinear least square*) dla najlepszego dopasowania funkcji (opisanej tym wzorem) do wyników z eksperymentów rzeczywistych dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody, II.2.4.1*). Wpływ poszczególnych zmiennych i interakcji na tempo wzrostu przetestowano sprawdzając przy pomocy testu t-studenta, czy wartości poszczególnych parametrów są istotnie różne od zera (Tabela 10).

Dla przewidywania wartości tempa wzrostu (interpolacji i ekstrapolacji) w ustalonych warunkach, aby w ten sposób oszacować dostosowanie (*fitness*) osobnika i przewidzieć jego zachowanie przy pomocy modelu symulacyjnego, został zastosowany uproszczony wzór 18. Uproszczenie wzoru było niezbędne dla uniknięcia nadmiernego dopasowania funkcji (ang. *overfitting*) do danych użytych do parametryzacji (*Materiał i metody, II.2.4.1*). W tym celu zostało zastosowane kryterium *Akaike* (*AIC*, Akaike 1974), które pozwala na wybór najlepszego modelu ze względu na jak największą wiarygodność i równocześnie jak najmniejszą złożoność. Zostały stworzone wszystkie możliwe uproszczone warianty wzoru 18, w których pominięto jeden, dwa lub więcej zależności (składników), poprzez ustawienie 0 jako wartości odpowiadających im parametrów. Następnie do każdej z tych uproszczonych formuł dopasowano wartości pozostałych parametrów nieliniową metodą najmniejszych kwadratów, aby móc obliczyć dla tej formuły wartość kryterium. Została obliczona również wartość kryterium dla alternatywnego modelu (i do jego uproszczonych wariantów) z liniową zależnością tempa wzrostu od pokarmu (oraz od pozostałych zmiennych). Tym razem jednak posłużono się standardową metodą najmniejszych kwadratów w regresji liniowej. Następnie zostały porównane wartości kryterium *Akaike* dla wszystkich wymienionych (liniowych i nieliniowych) dopasowań i wybrano ten wariant wzoru (spośród 262 kombinacji), który charakteryzował się najniższą wartością tego kryterium (Tabela 11). Wartości parametrów dla wybranego wzoru funkcji zostały podane w Tabeli 12. Zarówno oszacowanie wartości parametrów (we wzorze 18 i każdej uproszczonej kombinacji tego wzoru) za pomocą

nieliniowej, jak i linowej metody najmniejszych kwadratów, test t-studenta oraz porównane wartości kryterium *Akaike*, przeprowadzone zostało za pomocą programu statystycznego *R*.

Dla zbadania różnic w rozmieszczeniu pokarmu glonowego (albo rozmieszczonego równomiernie w całym słupie wody, albo tworzącego gradient z maksymalnym stężeniem przy powierzchni odpowiadającym stężeniu w wariancie z rozmieszczonym równomiernie pokarmem) na tempo wzrostu młodych i dojrzałych *Daphnia* (*Materiał i metody*, II.2.4.2) zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem *post-hoc* Tukey'a z rozmieszczeniem pokarmu oraz z klasą wiekową jako zmienną niezależną. Statystyka ta, jak również każda inna statystyczna analiza danych w rozprawie z wykorzystaniem ANOVA, została wykonana w programie Statistix 9.

Różnice między zależnością odległości reakcji ryby planktonożernej od natężenia światła dla 3 zakresów spektralnych (360-530, 530-660 i 660-880 nm) oraz dla dwóch klas wiekowych *Daphnia* (Rys. 16A) w eksperymentach rzeczywistych dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.3, Tabela 5) zostały zbadane za pomocą liniowego modelu mieszanego z zastosowaniem regresji i z uwzględnieniem tego, że eksperymenty przeprowadzone zostały dla trzech par ryb. Najpierw, na podstawie zmodyfikowanego wzoru z pracy Aknes'a i Giske'go (1993) zostało przyjęte, że odległość reakcji zależy od natężenia i spektrum światła oraz od wielkości *Daphnia* zgodnie z równaniem (19):

$$RD = e^{d'} \times L_{int}^{k'} \times e^{A_w \times l'} \times e^{E \times \alpha'} \times e^{B \times \varphi} \quad (19)$$

gdzie,  $RD$  – odległość reakcji ryby planktonożernej,  $L_{int}$  – natężenie światła ( $\mu\text{m} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ),  $A_w$  – wiek *Daphnia* (2,5 dniowe - młodych i 5,5 dniowe - dojrzałe),  $E$  i  $B$  to zmienne zerojedynkowe (ang. *dummy variables*) odpowiadające za kolor światła (dla światła czerwonego:  $E = 1$ ,  $B = 0$ , dla niebieskiego:  $E = 0$ ,  $B = 1$ , i dla zielonego:  $E = 0$ ,  $B = 0$ ), natomiast  $d'$ ,  $k'$ ,  $l'$ ,  $\alpha'$ ,  $\varphi$  to parametry. Następnie, zostały oszacowane wartości tych parametrów poprzez dopasowanie liniowego modelu mieszanego do wyników z eksperymentów rzeczywistych dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.3) po logarytmowaniu obydwu stron równania 19. Model mieszany został wybrany, ponieważ uwzględnia w dopasowaniu nie tylko zmienność między parami osobników, ale również zmienność w obrębie par osobników. Model ten został wykonany przy użyciu biblioteki *lme4* w programie statystycznym *R* (Bates i in. 2015). Czynnikiem losowym (ang. *random effect*) była zmienność współczynników regresji u poszczególnych par ryb (zarówno wyrazu wolnego, jak i nachyleń dla wszystkich czynników stałych –  $\ln(L_{int})$ ,  $A_w$ ,  $E$ ,  $B$ ). Zmienną

zależną był natomiast  $\ln(RD)$ . Po sparametryzowaniu wzoru, został przetestowany wpływ poszczególnych zmiennych na odległość reakcji za pomocą testu ilorazu wiarygodności (ang. *likelihood ratio test*, wykorzystującego rozkład chi-kwadrat), poprzez porównanie dopasowania modelu podstawowego (dla wszystkich zmiennych –  $\ln(L_{int})$ ,  $A_w$ ,  $E$ ,  $B$  z dopasowaniem po wyłączeniu jednej ze zmiennych (czyli z wartością parametru wstawioną jako 0, Tabela 13). Dodatkowo, dla wyznaczenia istotności różnic pomiędzy wpływem zakresu światła odpowiadającemu kolorowi niebieskiemu i czerwonemu na odległości reakcji (tego porównania brakowało we wzorze 19, gdzie parametry  $\alpha'$  i  $\varphi$  odpowiadały za różnicę między światłem zielonym a czerwonym oraz zielonym i niebieskim), został wykonany dodatkowy wariant modelu:

$$RD = e^{d''} \times L_{int}^{k''} \times A_w^{l''} \times e^{E \times \alpha''} \times e^{G \times \varphi'} \quad (20)$$

gdzie,  $G$  – to zmienna zerojedynkowa przyjmująca wartość 1, jeśli światło jest zielone i 0, jeśli światło ma inny kolor. Następnie, wyznaczona została wartość parametru  $\varphi'$  (za pomocą liniowego modelu mieszanego), który odpowiada różnicy wpływu koloru niebieskiego i czerwonego na odległość reakcji. Finalnie, za pomocą testu ilorazu wiarygodności, przeprowadzona została analiza statystyczna istotności wpływu tego parametru (Tabela 13).

Dla przewidywania wartości  $RD$  w ustalonych warunkach, aby w ten sposób oszacować dostosowanie (*fitness*) osobnika i przewidzieć jego zachowanie przy pomocy modelu symulacyjnego, został zastosowany uproszczony wzór 19. Dla wybrania uproszczonego wzoru, zastosowane zostało kryterium *Akaike* ( $AIC$ , Akaike 1974). Zostały stworzone wszystkie możliwe uproszczone warianty wzoru 19, w których pominięto jeden, dwa lub więcej zależności (składników), poprzez ustawienie 0 jako wartości odpowiadających im parametrów. Następnie do każdej z tych uproszczonych formuł dopasowano wartości pozostałych parametrów za pomocą liniowego dopasowania (w modelu mieszanym ze strukturą efektów losowych taką, jak dla pełnej wersji modelu przy analizie statystycznej) dla kolejnych wersji wzoru na  $RD$ : pełnego (uwzględniającego wszystkie 4 zmienne ( $\ln(L_{int})$ ,  $A_w$ ,  $E$ ,  $B$ ), z pominiętym jednym składnikiem, z pominiętymi dwoma składnikami *etc.* Następnie spośród wszystkich wersji modelu (łącznie 15) wybrano ten wariant, który charakteryzował się najniższą wartością tego kryterium (wzór 11, *Materiał i metody*, II.2.2). Po ustaleniu tego wzoru i dopasowaniu do niego wartości parametrów dla poszczególnych kolorów, możliwe było wyznaczenie zależności  $RD$  dla światła będącego mieszkanką trzech zakresów spektralnych (wzór 12, *Materiał i metody*, II.2.2). Wymienione analizy dla zależności  $RD$  od

wieku *Daphnia* oraz intensywności i koloru światła zostały wykonane za pomocą pakietu statystycznego R.

Dla zbadania oszacowanego tempa konsumpcji ryby planktonożerne w zależności od natężenia światła, składu spektralnego światła (dla 3 zakresów spektralnych) dla dwóch klas wiekowych *Daphnia* (Rys. 16B i C) w eksperymentach rzeczywistych dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.3, Tabela 5), zastosowano trzyczynnikową ANOVA z testem *post-hoc* Tukey'a.

Dla dokładniejszego przewidywania wartości tempa konsumpcji przez rybę planktonożerną (a więc i ryzyka śmierci *per capita*) w różnych zagęszczeniach planktonowej ofiary, aby w ten sposób oszacować dostosowanie osobnika i przewidzieć jego zachowanie przy pomocy modelu symulacyjnego, został zastosowany wzór 13 (*Materiał i metody*, II.2.2). Wzór ten został sparametryzowany za pomocą nieliniowej metody najmniejszych kwadratów dla najlepszego dopasowania funkcji do wyników z eksperymentów rzeczywistych dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.4, Rys. 17), przy czym to dopasowanie nie było oparte na tempie konsumpcji ofiar, a na jego zamienniku, czyli na liczbie zjedzonych ofiar planktonowych w poszczególnych eksperymentach (*Materiał i metody*, II.2.2, wzór 16-17). Wpływ zmiennych na tempo konsumpcji został zbadany przy pomocy testu t-studenta (Tabela 14). Test ten posłużył równocześnie dla sprawdzenia, czy najlepsze dopasowanie jest zgodne z II, czy z III typem odpowiedzi funkcjonalnej, przy założeniu, że tylko w II typie odpowiedzi wartość parametru  $\gamma$  nie jest istotnie różna od 0. Analiza ta została wykonana w pakiecie statystycznym R.

Dla zbadania różnic w prędkości ryby między trybem przemieszczania się jej w poszukiwaniu dogodniejszego miejsca i trybem żerowania oraz między dwoma (z dziesięciu) losowo wybranymi zbiornikami (Rys. 18) jednego z bliźniaczych układów (układ A) dużego systemu eksperymentalnego dla badania zachowań pokarmowych ryb żerujących w dużej grupie (Rys. 12) w eksperymentach dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.4) zastosowana została dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniami.

Dla wyznaczenia czasu niezbędnego dla ustalenia się równowagi dynamicznej w rozmieszczeniu *Daphnia* młodych i dojrzałych w wysokim i w niskim zagęszczeniu ich populacji (Rys. 19) w wariantach z przepływem w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.2, Tabela 7), zastosowana została prosta i umowna miara, polegająca na ustaleniu czasu (z dokładnością  $\pm 15$  minut), w którym po raz pierwszy od startu eksperymentu średnia głębokość, na której przebywały osobniki, różniła się o mniej niż 10 % od średniej głębokości, na której przebywały po następnych 30 minutach (podczas

kolejnej obserwacji). Dla zbadania wpływu kierunkowego przepływu medium od dołu ku górze w kolumnach „właściwej wersji układu eksperymentalnego dla badania pionowego rozmieszczenia zooplanktonu” (*Materiał i metody, II.2.3.4*) na rozmieszczenie *Daphnia* w stanie równowagi (w 120, 150 i 180 minucie każdego eksperymentu), zarówno dla osobników młodych, jak i dojrzałych, w wysokim i w niskim zagęszczeniu ich populacji, przebywających w kolumnie L lub P w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody, II.2.5.2*, Tabela 7), zastosowano czteroczynnikową ANOVA z powtórzeniami z testem *post-hoc* Tukey’a.

Dla zbadania średniej głębokości wybieranej przez *Daphnia* (młode i dojrzałe) w różnym zagęszczeniu ich populacji (Rys. 21) w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody, II.2.5.3*, Tabela 8a i 8b oraz *Materiał i metody, II.2.5.4*, Tabela 9a, 9b i 9c), przeprowadzonych we „właściwej wersji układu eksperymentalnego dla badania pionowego rozmieszczenia zooplanktonu” (*Materiał i metody, II.2.3.4*), została zastosowana regresja liniowa (Tabela 15), polegająca na sprawdzeniu, w pierwszym etapie, istotności nachylenia regresji odzwierciedlającej przebieg danych dla dwóch wariantów łącznie, a w drugim etapie, istotności różnic w nachyleniu i wzniesieniu (ang. *intercept*) pomiędzy dwiema regresjami, każdej odzwierciedlającej przebieg danych dla jednego z tych wariantów. Analiza ta została wykonana dla 12 porównań: między młodymi i dojrzałymi w nieobecności któregośkolwiek gradientu, w gradiencie pokarmu, w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie i w obydwu gradientach (4 porównania), dla młodych oraz dla dojrzałych między wariantem w nieobecności któregośkolwiek gradientu i w obecności gradientu pokarmu (2 porównania), między wariantem w nieobecności któregośkolwiek gradientu i w samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie (2 porównania), między wariantem z gradientem informacji o niebezpieczeństwie i z obydwoma gradientami (2 porównania) i między wariantem z gradientem pokarmu i z obydwoma gradientami (2 porównania). Poziom istotności ustalony został zgodnie z poprawką Bonferroniego na 0,00417 ( $\alpha = 0,05/12$ ). Każda grupa danych dla dorosłych lub dla młodych składała się z 8-9 punktów, każdemu odpowiadającemu uśrednionej głębokości wybieranej przez grupę osobników w jednym eksperymencie (*Materiał i metody, II.2.5.3*, Tabela 8a i 8b) oraz z 2 dodatkowych punktów, odpowiadających uśrednionej głębokości wybieranej przez pojedyncze osobniki w eksperymentach przeprowadzonych w kolumnie L lub w kolumnie P w „eksperymentach dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki” (*Materiał i metody, II.2.5.4*, Tabela 9a, 9b i 9c). Wymienione analizy zostały wykonane w programie Statistix 9.

Dla zbadania różnic w rozmieszczeniu *Daphnia* (młodych, Tabela 17 i dojrzałych, Tabela 18) w różnych zagęszczeniach ich populacji w symulacjach (*Materiał i metody*, II.2.6) i w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, Tabela 8a i 8b oraz *Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a, 9b i 9c) w każdym z 4 wariantów (kombinacji gradientów) osobno dla każdej z dwóch klas wiekowych, zastosowane zostało porównanie (nachylenia i wzniesienia) linii regresji (Tabela 17 i 18). Analiza ta została wykonana dla wszystkich 4 scenariuszy założeń modelowych (*Materiał i metody*, II.2.6). Poziom istotności został ustalony zgodnie z poprawką Bonferroniego na 0,0125 ( $\alpha = 0,05/4$ ). Wymienione analizy zostały wykonane w programie Statistix 9.

Dla porównania rozkładów pionowego rozmieszczenia *Daphnia* (młodych, Rys. 25 i 26 oraz dojrzałych, Rys. 27 i 28) w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, puste pola) i w eksperymentach wirtualnych powstałych wskutek symulacji (*Materiał i metody*, II.2.6) w tych samych zagęszczeniach populacji (osobno dla eksperymentów przeprowadzonych w wysokim – Rys. 26 i 28 i w niskim zagęszczeniu, Rys. 25 i 27) dla każdego z 4 scenariuszy założeń modelu optymalizacyjnego, zastosowana została średnia (głębokość, na której przebywały osobniki)  $\pm$  odchylenie standardowe. Nie wykorzystano w tym przypadku testów statystycznych, ponieważ duża liczba powtórzeń symulacji i pomiarów w trakcie pojedynczego eksperymentu losowego pozwala niemal wyeliminować błąd losowy, dzięki czemu oszacowanie średnich głębokości można uznać za równe wartości średniej w całej populacji.

Dla zbadania różnic w wyborze głębokości podejmowanym przez pojedyncze osobniki, zarówno młode, jak i dojrzałe, między 4 wariantami w eksperymentach przeprowadzonych dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki (*Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a-c), zastosowano dwuczynnikową ANOVA z klasą wiekową oraz kolumną eksperymentalną L lub P jako zmiennymi zależnymi.

Ruchliwość pojedynczych *Daphnia* (młodych i dojrzałych) w każdym z czterech wariantów w eksperymentach przeprowadzonych dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki (*Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a-c), została wyznaczona jako średnia (dla wszystkich osobników w danym wariantcie) suma wartości bezwzględnych zmian głębokości (z dokładnością do jednego sektora układu) podejmowanych przez pojedyncze osobniki w trakcie 20 minut (Tabela 19). Zróznicowanie ruchliwości między osobnikami w każdym wariantcie wyznaczone zostało za pomocą odchylenia standardowego średniej ruchliwości poszczególnych osobników (Tabela 19). Zróznicowanie wybieranych głębokości przez pojedyncze *Daphnia* (młode i dojrzałe) w każdym z czterech wariantów zostało

wyznaczone za pomocą pomiaru uśrednionego dla wszystkich osobników w danym wariancie odchylenia standardowego od średniej głębokości, na której przebywał osobnik. Różnice między osobnikami w ich zróżnicowaniu względem wybieranych głębokości zostały wyznaczone za pomocą odchylenia standardowego dla odchyleń standardowych od średniej głębokości, na której przebywał każdy osobnik (Tabela 19).

Dla zbadania różnic w każdym z 4 wariantów w rozmieszczeniu *Daphnia* w wysokim zagęszczeniu ich populacji w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, Tabela 8a i 8b oraz *Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a, 9b i 9c) i w wyborze głębokości podejmowanym przez pojedyncze osobniki (*Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a-c), zastosowana została dwuczynnikowa ANOVA z klasą wiekową oraz kolumną L lub P jako zmiennymi zależnymi.

Dla zbadania różnic w pionowym rozmieszczeniu *Daphnia* (młodych, Rys. 29 i dojrzałych, Rys. 30) w wysokim zagęszczeniu ich populacji w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych przeprowadzonych dla grupy osobników (*Materiał i metody*, II.2.5.3, Tabela 8a i 8b) i w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych przeprowadzonych dla pojedynczych osobników (*Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a-c) w każdym z 4 wariantów eksperymentalnych, zastosowana została średnia (głębokość, na której przebywały osobniki)  $\pm$  odchylenie standardowe.

### III. Wyniki

#### III.1. Parametryzacja modelu

##### III.1.1. Zależność tempa wzrostu od stężenia pokarmu, zagęszczenia populacji *Daphnia*, wieku osobnika oraz od natężenia światła

Tempo wzrostu *Daphnia* w eksperymentach dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.1) zależało istotnie jedynie od stężenia pokarmu glonowego oraz od interakcji między wiekiem *Daphnia* i natężeniem światła (Rys. 13 i 14, Tabela 10). Również wyraz wolny był istotnie różny od zera, co znaczy, że nawet w nieobecności pokarmu glonowego tempo wzrostu osobników było istotnie większe od 0. Może to wynikać z obecności znacznej ilości pokarmu bakteryjnego w mediach eksperymentalnych, pomimo filtrowania wody na media przez filtry z drobną średnicą porów ( $0,2 \mu\text{m}$ ), ale może to być również artefaktem użytego modelu statystycznego (przy bardzo niskich stężeniach pokarmu tempo wzrostu może być niższe, niż wynika ze wzoru 18). Istotna interakcja między wiekiem i natężeniem światła

znaczyć może natomiast, że światło, będące główną składową informacji o niebezpieczeństwie ze strony ryby planktonożernej, silniej spowalnia tempo wzrostu osobników dojrzałych, niż młodych. Zależność indywidualnego tempa wzrostu *Daphnia* ( $Gr$ ) od czterech zmiennych niezależnych oraz od interakcji między wiekiem *Daphnia* i każdą z trzech pozostałych zmiennych została wprowadzona do modelu symulacyjnego w postaci jednego z wariantów wzoru 18 (wzór 6, *Materiał i metody*, II.2.2), który otrzymał najniższą wartość zgodnie z kryterium *Akaike* (Tabela 11 i 12):

$$Gr = (-0,2375 \times e^{F_{conc} \times (-3,5080)}) + (-0,000027 \times D_D) + (-0,0249 \times L_{int} \times A) + 0,2142 \quad (21)$$

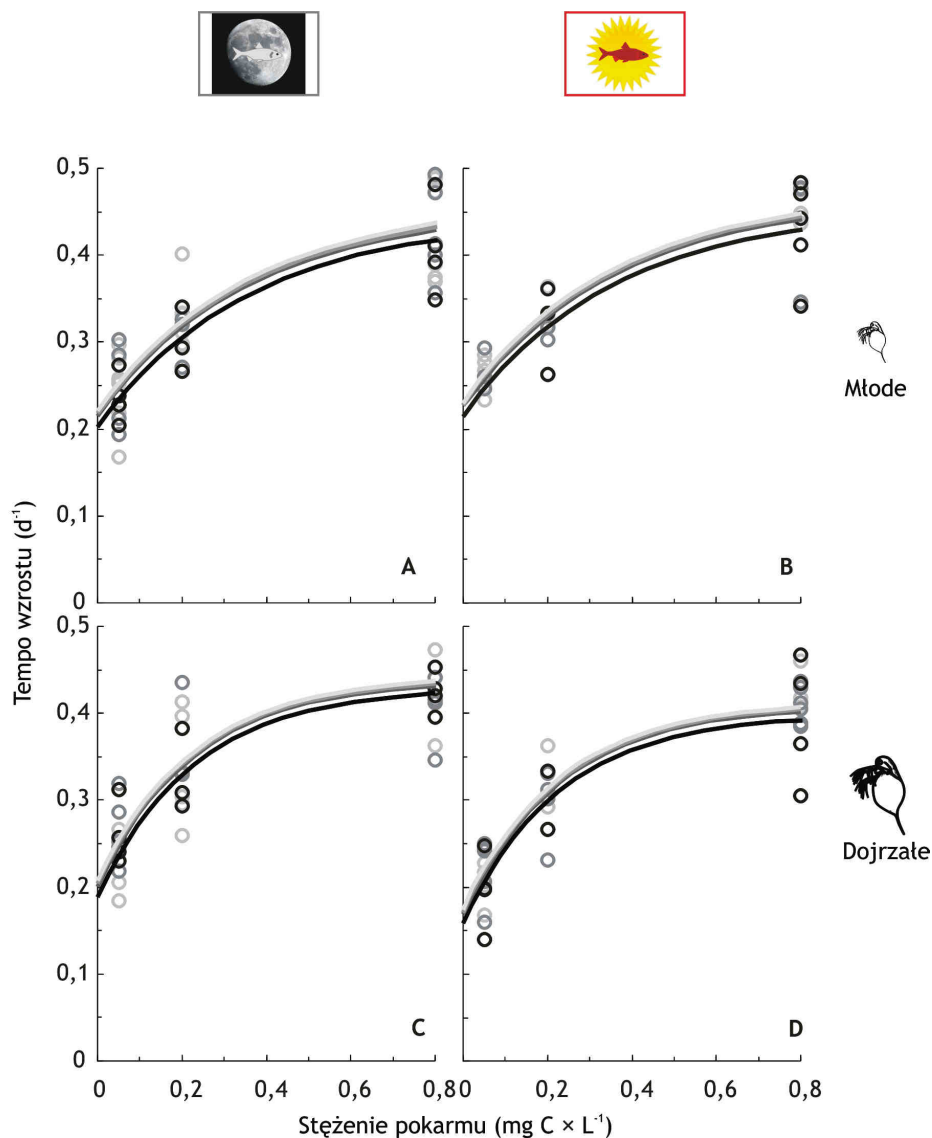
(Wzór 6 z podstawionymi do niego wartościami liczbowymi parametrów).

**Tabela 10.** Wyniki dopasowania, nieliniową metodą najmniejszych kwadratów, wartości parametrów dla funkcji  $Gr = (a_1' \times e^{F_{conc} \times a_2'}) + (b' \times D_D) + (c' \times L_{int}) + (f' - (2 \times a_1')) + (o \times e^{F_{conc} \times a_2'} \times A) + (a_1' \times e^{F_{conc} \times r \times A}) + (s \times D_D \times A) + (u \times L_{int} \times A) + (z - (o \times A))$  obrazującej zależność tempa wzrostu *Daphnia* od stężenia pokarmu (parametry  $a_1'$  i  $a_2'$ ), zagęszczenia populacji *Daphnia* ( $b'$ ), natężenia światła ( $c'$ ), od wyrazu wolnego ( $f'$ ), interakcji między wiekiem i stężeniem pokarmu ( $o$  i  $r$ ), interakcji między wiekiem i zagęszczeniem populacji ( $s$ ), interakcji między wiekiem i natężeniem światła ( $u$ ) i od wieku osobnika ( $z$ , młodych lub dojrzałych). Test t-studenta (t-wartości oraz odpowiadające im wartości  $P$  dla poszczególnych parametrów) testuje hipotezę zerową, że oszacowany parametr wynosi 0 (gdy pozostałe parametry mają taką wartość, jak w kolumnie „Wartość parametru”) przy  $P < 0,005$  (różnice istotne zaznaczone pogrubioną czcionką). Poziom istotności został ustalony po uwzględnieniu poprawki Bonferroniego ( $\alpha = 0,05/10$ ) dla 10 testów

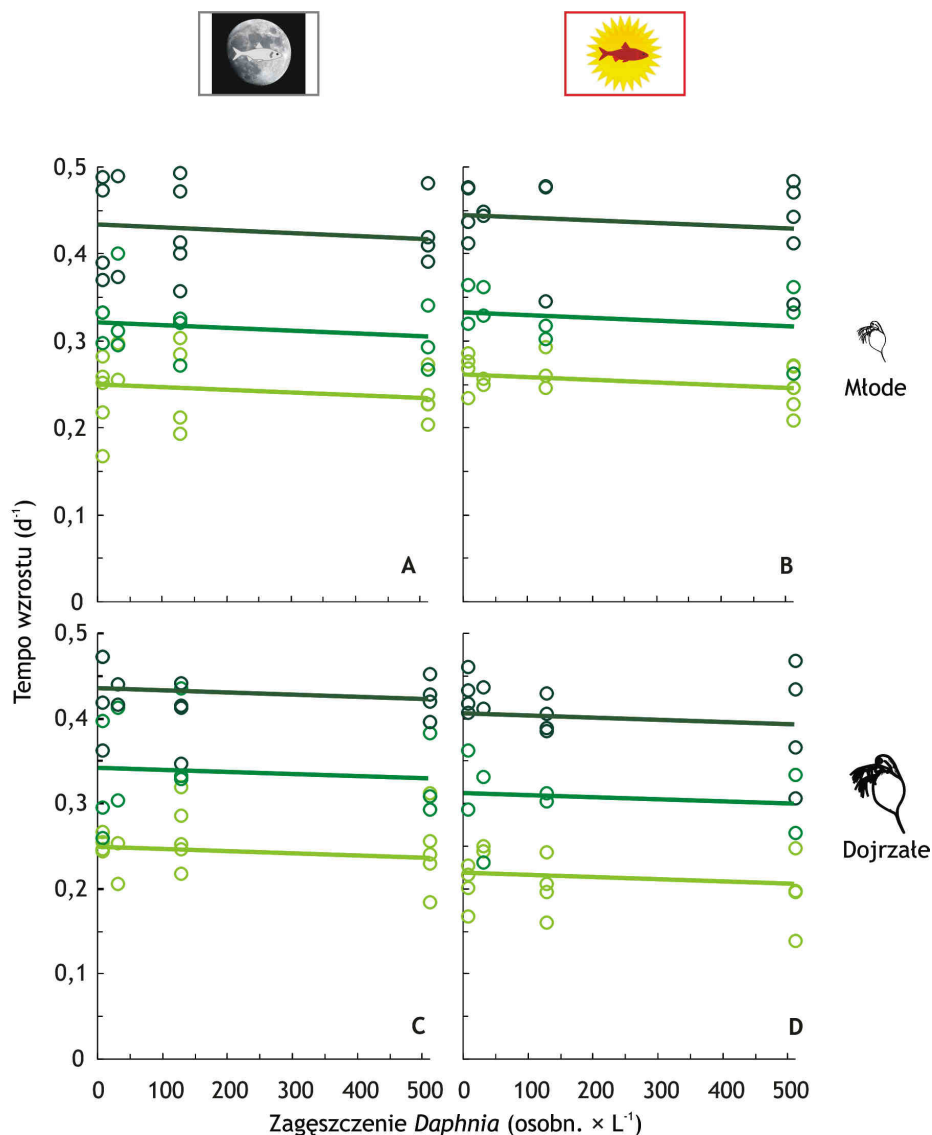
Parametr	Wartość parametru	Błąd standardowy	Wartość testu t-studenta	$P$
$a_1'$	-0,2408	0,0162	-14,859	<b>&lt; 0,0001</b>
$a_2'$	-2,7720	0,7670	-3,614	<b>0,0004</b>
$b'$	-0,0000320	0,0000203	-1,578	0,1166
$c'$	0,0107	0,0073	1,464	0,1452
$f'$	0,2189	0,0141	15,586	<b>&lt; 0,0001</b>
$o$	-0,1308	0,1128	-1,159	0,2481
$r$	0,4416	0,2936	1,504	0,1347
$s$	0,0000070	0,0000294	0,238	0,8120
$u$	-0,0360	0,0105	-3,443	<b>0,0007</b>
$z$	-0,0123	0,0181	-0,681	0,4969

Liczba stopni swobody = 149





**Rysunek 13.** Zależność tempa wzrostu młodych (A, B) i dojrzałych (C, D) *Daphnia longispina* od stężenia pokarmu w czterech wariantach zagęszczenia jej populacji (8, ○ ; 32, ◐ ; 128, ● ; i 512, ● osbn. × L<sup>-1</sup>) w eksperymentach dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody, II.2.4.1*) zobrazowana jako najlepsze dopasowanie parametrów we wzorze 17 (*Materiał i metody, II.2.7*) do danych z eksperymentów za pomocą nieliniowej metody najmniejszych kwadratów.



**Rysunek 14.** Zależność tempa wzrostu młodych (A, B) i dojrzałych (C, D) *Daphnia longispina* od zagęszczenia jej populacji w niskim ( $0,05 \text{ mg C} \times \text{L}^{-1}$ ,  $\circ$ ), pośrednim ( $0,2 \text{ mg C} \times \text{L}^{-1}$ ,  $\bullet$ ) i wysokim ( $0,8 \text{ mg C} \times \text{L}^{-1}$ ,  $\bullet$ ) stężeniu pokarmu w eksperymentach dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.1) zobrażowana jako najlepsze dopasowanie parametrów we wzorze 17 (*Materiał i metody*, II.2.7) do danych z eksperymentów za pomocą nieliniowej metody najmniejszych kwadratów.

**Tabela 11.** Wyniki dla kryterium *Akaike* (*AIC*, z uwzględnieniem "kary" wynikającej z liczby parametrów w wariancie funkcji), za pomocą którego został dopasowany, do danych z eksperymentów rzeczywistych dla parametryzacji modelu, najlepszy wariant funkcji obrazującej zależność indywidualnego tempa wzrostu *Daphnia* (*Gr*) od czterech zmiennych niezależnych: stężenia pokarmu glonowego ( $F_{conc}$ ), zagęszczenia populacji *Daphnia* ( $D_D$ ), natężenia światła ( $L_{int}$ ) i wieku *Daphnia* (*A*) oraz od interakcji między wiekiem *Daphnia* i każdą z trzech pozostałych zmiennych. Przy wyborze najlepszego wariantu wzięty został pod uwagę typ funkcji (eksponencjalny lub liniowy) oraz każda możliwa kombinacja czterech zmiennych (pokarm, zagęszczenie, natężenie światła i wiek) i każda możliwa interakcja wieku z pozostałymi trzema zmiennymi. W tabeli pokazane zostały wyniki dla 6 wariantów wzoru (spośród 262 wszystkich wariantów) z najlepszym dopasowaniem (im niższa wartość tym lepszy model)

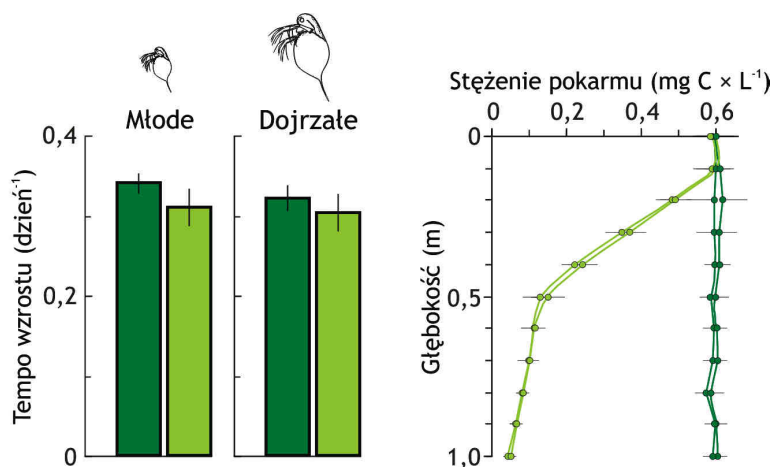
Wariant funkcji	Wartość kryterium
$Gr = (a_1 \times e^{F_{conc} \times a_2}) + (b \times D_D) + (u \times L_{int} \times A) + f$	-571
$Gr = (a_1 \times e^{F_{conc} \times a_2}) + (b \times D_D) + (c \times L_{int}) + (u \times L_{int} \times A) + f$	-570
$Gr = (a_1 \times e^{F_{conc} \times a_2}) + (u \times L_{int} \times A) + f$	-569
$Gr = (a_1 \times e^{F_{conc} \times a_2}) + (b \times D_D) + (c \times L_{int}) + (u \times L_{int} \times A) + f + (z \times A)$	-569
$Gr = (a_1 \times e^{F_{conc} \times a_2}) + (b \times D_D) + (s \times D_D \times A) + (u \times L_{int} \times A) + f$	-569
$Gr = (a_1 \times e^{F_{conc} \times a_2}) + (b \times D_D) + (u \times L_{int} \times A) + f + (z \times A)$	-569

**Tabela 12.** Wyniki dopasowania, nieliniową metodą najmniejszych kwadratów (*Nonlinear least square*), wartości parametrów dla funkcji  $Gr = (a_1 \times e^{F_{conc} \times a_2}) + (b \times D_D) + (u \times L_{int} \times A) + f$ , która została wprowadzona do modelu symulacyjnego, obrazującej zależność tempa wzrostu *Daphnia* od wybranych (za pomocą metody wyboru minimalnego modelu stosując kryterium *AIC*) zmiennych (stężenia pokarmu –  $F_{conc}$  - i zagęszczenia populacji -  $D_D$ ) i interakcji (między natężeniem światła -  $L_{int}$  - i wiekiem *Daphnia* – *A*)

Parametr	Wartość parametru	Błąd standardowy
$a_1$	-0,2375	0,0093
$a_2$	-3,5080	0,5570
$b$	-0,000027	0,000015
$u$	-0,0249	0,0062
$f$	0,2142	0,0169

### III.1.2. Spowolnienie tempa wzrostu *Daphnia* w gradiencie pokarmu w wyniku braku perfekcyjnej wiedzy o zasobności każdego miejsca

Tempo wzrostu w eksperymentach dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.2) było istotnie większe w wariancie z homogenicznie rozmieszczonym pokarmem glonowym, niż w wariancie z gradientem pokarmu (dwuczynnikowa ANOVA,  $F_{1,44} = 14,10$ ,  $P = 0,0005$ , Rys. 15), co świadczy o tym, że brak perfekcyjnej wiedzy *Daphnia* o zasobności każdego miejsca (głębokości) powoduje spowolnienie jej wzrostu. Test *post-hoc* Tukey'a wykazał tę zależność zarówno dla osobników młodych (spowolnienie o 9,2 %), jak i dojrzałych (spowolnienie o 2,7 %, Rys. 3 oraz Rys. 15). Na podstawie tych różnic wyznaczona została wartość parametrów we wzorze 2 ( $\alpha_{F,juv} = 0,19$  dla osobników młodych i  $\alpha_{F,ad} = 0,08$  dla osobników dojrzałych, *Materiał i metody*, II.2.2) niezbędnych dla wprowadzenia błędu *Daphnia* w szacowaniu stężenia pokarmu (i tym samym tempa wzrostu). Odchylenie standardowe dla uśrednionego tempa wzrostu osobników przebywających w gradiencie pokarmu było większe, niż dla uśrednionego tempa wzrostu osobników przebywających w homogenicznie rozmieszczonym pokarmie i wynosiło odpowiednio, 0,023 i 0,013 dla osobników młodych oraz 0,023 i 0,016 dla osobników dojrzałych.



**Rys. 15.** Tempo wzrostu (średnia  $\pm$  1SD) *Daphnia longispina* (młodych i dojrzałych) w eksperymentach dla parametryzacji modelu, polegających na wyznaczeniu konsekwencji braku perfekcyjnej wiedzy o zasobności każdego miejsca (*Materiał i metody*, II.2.4.2), przeprowadzonych w trzeciej (właściwej) wersji układu eksperymentalnego dla badania rozmieszczenia zooplanktonu (*Materiał i metody*, II.2.3.4). Wykres na prawym panelu przedstawia gradient pokarmu w eksperymentach. *Daphnia* przebywały albo w równomiernie rozmieszczonym pokarmie glonowym, którego stężenie wynosiło 0,6 mg C  $\times$  L<sup>-1</sup> (stężenie relatywnie wysokie, bliskie poziomowi, przy którym tempo wzrostu *Daphnia* jest maksymalne, ciemnozielone słupki i linie), albo w gradiencie pokarmu (podobnym do gradientu pokarmu w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych, *Materiał i*

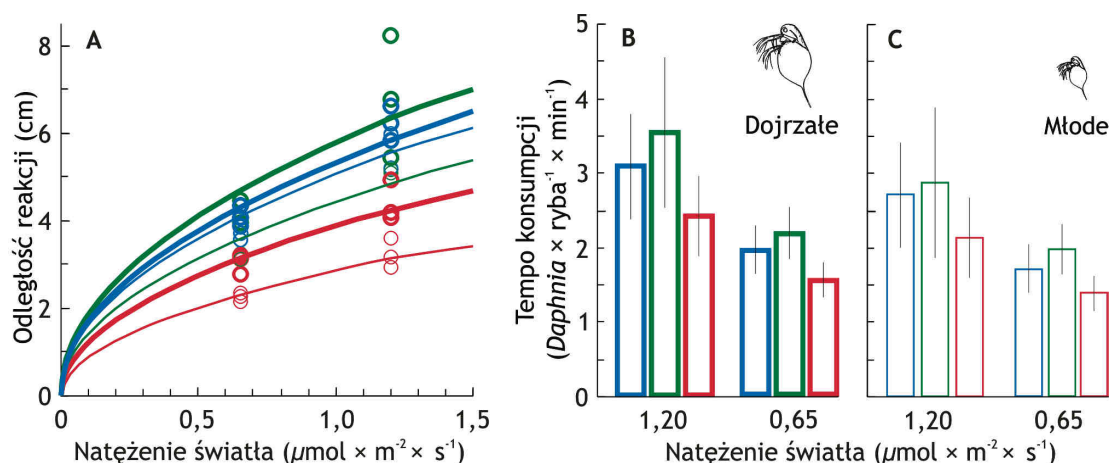
metody, II.2.6, Rys. 18), w którym jedynie w dwóch górnych sektorach stężenie wynosiło  $0,6 \text{ mg C} \times \text{L}^{-1}$ , natomiast we wszystkich pozostałych sektorach była niższa (jasnozielone słupki i linie). Wysokość każdego słupka obrazuje średnią wartość tempa wzrostu wyznaczoną dla 3 osobników przebywających w każdej z dwóch kolumn (L lub P) w każdym z 4 eksperymentów ( $3 \times 2 \times 4$ , Tabela 4).

### III.1.3. Zależność odległości reakcji ryby planktonożernej od natężenia i składu spektralnego światła

Odległość reakcji ryby planktonożernej zwiększała się wraz ze wzrostem natężenia światła (istotny wpływ parametru  $k'$ , Tabela 13). Wpływ wieku *Daphnia* na  $RD$  był na granicy istotności (parametr  $l'$ , Tabela 13).  $RD$  była istotnie mniejsza w świetle czerwonym, niż w świetle zielonym (ujemna wartość parametru  $\alpha'$ ), nieistotnie różna w zakresach odpowiadających kolorowi niebieskiemu i zielonemu ( $\varphi'$ ) oraz istotnie większa w świetle odpowiadającym kolorowi niebieskiemu, niż czerwonemu ( $\alpha''$ , Tabela 13, Rys. 16A).

Zależność  $RD$  od natężenia światła, wieku *Daphnia* i składu spektralnego została wprowadzona do modelu symulacyjnego w postaci wzoru 11 ( $RD = e^{-3,079} \times L_{int,n}^{0,7052} \times e^{A \times 0,2183} \times e^{E \times -0,3999}$ ), który po jego sparametryzowaniu za pomocą liniowego modelu mieszanego otrzymał najniższą wartość spośród wszystkich wariantów opisujących tę zależność zgodnie z kryterium Akaike (-19,2).

Tempo konsumpcji *Daphnia* również zależało od natężenia światła ( $F_{1,21} = 24,07$ ,  $P = 0,0001$ ) oraz od zakresu spektralnego ( $F_{2,21} = 5,02$ ,  $P = 0,0165$ , trzyczynnikowa ANOVA, Rys. 16B i C). Test *post-hoc* Tukey'a wykazał istotną różnicę w tempie konsumpcji między wysokim i niskim natężeniem światła, zarówno dla ryby żerującej na osobnikach młodych, jak też na dojrzałych. Ta sama analiza statystyczna wykazała również, że tempo konsumpcji jest wyższe w świetle zielonym, niż w czerwonym, zarówno dla ryby żerującej na młodych, jak również na dojrzałych *Daphnia* oraz w świetle niebieskim, niż w czerwonym, jedynie dla ryby żerującej na osobnikach dojrzałych. Czas manipulacji ofiarą ( $T_h$ ) wyniósł  $0,98 \pm 0,10$  sekundy (Tabela 2).



**Rys. 16.** Odległość reakcji (każdy punkt jest średnią z 3 pomiarów otrzymanych na podstawie danych z jednego eksperymentu, A) oraz tempo konsumpcji (średnia z 3 eksperymentów  $\pm$  SD, B i C) ryby planktonożernej względem dorosłej (pogrubione linie i koła) i młodej (cienkie linie i koła) *D. longispina* w zależności od natężenia światła oraz zakresu spektralnego (360-530 nm – niebieska linia, 530-660 nm – zielona linia, 660-880 nm – czerwona linia) światła w eksperymentach rzeczywistych dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.3, Tabela 5). Linie trendu dla zależności odległości reakcji od natężenia światła dla obydwu klas wiekowych i dla każdego z 3 zakresów spektrum (A) powstały w wyniku parametryzacji (za pomocą liniowego modelu mieszanego) wzoru 11 (*Materiał i metody*, II.2.2).

**Tabela 13.** Wyniki dopasowania liniowym modelem mieszanym wartości parametrów  $d'$ ,  $k'$ ,  $l'$ ,  $\alpha'$ ,  $\varphi$  dla funkcji 19 ( $RD = e^{d'} \times L_{int}^{k'} \times A_w^{l'} \times e^{E \times \alpha'} \times e^{B \times \varphi}$ ) i parametru  $\varphi'$  dla funkcji 20 ( $RD = e^{d''} \times L_{int}^{k''} \times A_w^{l''} \times e^{E \times \alpha''} \times e^{G \times \varphi'}$ ) obrazujących zależność odległości reakcji ryby planktonożerne ( $RD$ ) od wyrazu wolnego ( $d'$ ), natężenia światła ( $L_{int}^{k'}$ ), wieku *Daphnia* ( $A_w^{l'}$ ), obecności koloru czerwonego ( $e^{E \times \alpha'}$ ), obecności koloru niebieskiego ( $e^{B \times \varphi}$ ) oraz obecności koloru zielonego ( $e^{G \times \varphi'}$ ) w spektrum do wyników z eksperymentów dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.3) oraz wyniki analizy statystycznej tego dopasowania za pomocą testu ilorazu wiarygodności. Różnice istotne zaznaczone zostały pogrubioną czcionką. Poziom istotności został ustalony po uwzględnieniu poprawki Bonferroniego ( $\alpha = 0,0083$ ) dla 6 testów (0,05/6)

Parametr	Numer wzoru	Wartość parametru	Błąd standardowy	Wartość testu Chi <sup>2</sup>	DF	P
$d'$	14	-3,0905	0,0391	- *	- *	- *
$k'$	14	0,7026	0,0556	13,840	1	<b>0,0002</b>
$l'$	14	0,2101	0,0461	6,4430	1	0,0111
$\alpha'$	14	-0,3919	0,0411	12,465	1	<b>0,0004</b>
$\varphi'$	14	0,0214	0,0514	0,1701	1	0,6800
$\alpha''$	15	-0,4133	0,0485	10,324	1	<b>0,0013</b>

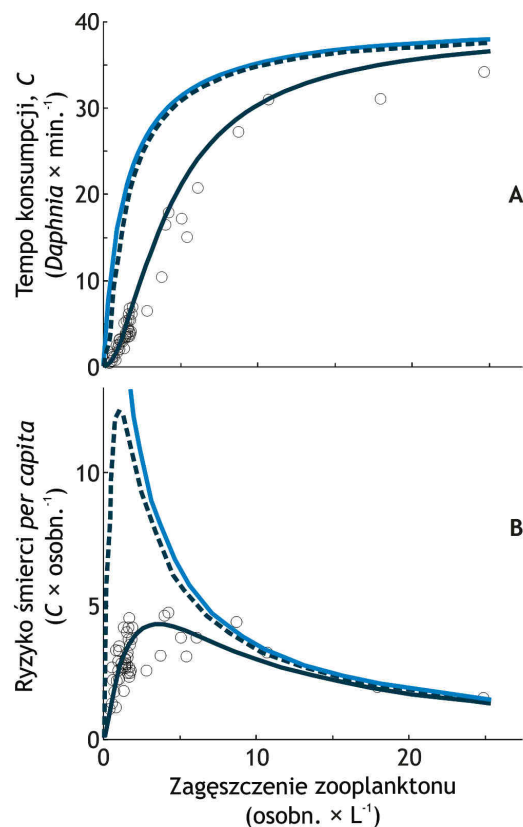
\*Analiza statystyczna nie dała wyniku istotności dla parametru  $d'$  (ang. *intercept*), co najprawdopodobniej wynikało z tego, że każde dopasowanie dla  $d' = 0$  było bardzo złe (a więc wpływ tego parametru był bardzo silny).

### III.1.4. Zależność ryzyka śmierci *per capita* ze strony ryby planktonożernej od zagęszczenia populacji zooplanktonu

Parametryzacja wzoru 13 i 14 (*Materiał i metody, II.2.2*) na podstawie danych z eksperymentów dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody, II.2.4.4*) wykazała, że wartości parametrów  $\gamma$  i  $n$  są istotnie różne od 0 (Tabela 14), co świadczy o tym, że kształt odpowiedzi funkcjonalnej ryby planktonożernej w tych eksperymentach był zgodny z III, a nie z II typem (Rys. 17A). Potwierdza to przebieg ryzyka śmierci *per capita* w różnym zagęszczeniu planktonowej ofiary (Rys. 17B), w którym przy niskich zagęszczeniach ryzyko śmierci jest niższe (tak, jak przewiduje III typ), a nie wyższe (tak, jak przewiduje II typ), niż przy pośrednich zagęszczeniach. Prędkość ryby zmierzona w eksperymentach przeprowadzonych w dużym układzie dla badania zachowań pokarmowych dużej grupy ryb (*Materiał i metody, II.2.4.4*) wynosiła  $14,90 \pm 2,79 \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$  dla ryb przemieszczających się, natomiast  $5,62 \pm 1,99 \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$  dla ryb żerujących (Rys. 18). Obie prędkości były istotnie różne od siebie ( $F_{1,48} = 759$ ,  $P = 0,0010$ , dwuczynnikowa ANOVA z powtórzeniami).

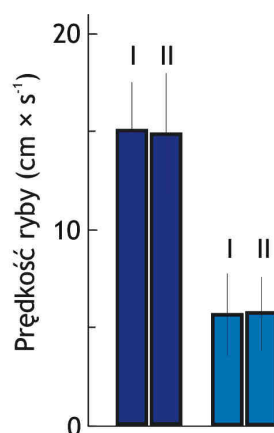
**Tabela 14.** Wyniki dopasowania, nieliniową metodą najmniejszych kwadratów (*Nonlinear least square*), wartości parametrów  $\gamma$  i  $n$  dla przebiegu odpowiedzi funkcjonalnej, czyli zależność obrazującej zmiany tempa konsumpcji drapieżcy od zagęszczenia populacji ofiary opisanej wzorem 13 i 14 (*Materiał i metody, II.2.2*). Test t-studenta testuje hipotezę, że oszacowany parametr jest różny od zera przy  $P < 0,05$  (różnice istotne zaznaczone pogrubioną czcionką). Ostatecznie, wartości tych parametrów posłużyły dla wyznaczenia przebiegu odpowiedzi funkcjonalnej jedynie względem różnych zagęszczeń młodych *Daphnia*. Dla wyznaczenia przebiegu funkcji względem różnych zagęszczeń osobników dojrzałych, jedynie wartość parametru  $n$  pozostała taka sama, natomiast wartość parametru  $\gamma$  została przyjęta arbitralnie ( $\gamma_{ad} = 0,03416$ ), przyjmując założenie (zgodnie z rozumowaniem zawartym w pracy Gliwicza, Maszczyka, Jabłońskiego i Wrzoska 2013), że progowe zagęszczenie, przy którym ryba zaczyna żerować, jest niższe o dwa rzędy wielkości dla osobników dojrzałych, niż dla osobników młodych

Parametr	Wartość parametru	Błąd standardowy	Wartość testu t-studenta	<i>P</i>
$\gamma_{juv}$	3,4158	1,0278	3,323	<b>0,00181</b>
<i>n</i>	0,8465	0,1426	5,938	<b>&lt; 0,00001</b>



**Rys. 17.** Odpowiedź funkcjonalna ryby planktonożernej, czyli zależność tempa konsumpcji ofiar planktonowych od zagęszczenia ich populacji (A) oraz zależność ryzyka śmierci *per capita* ze strony ryby planktonożernej (jako iloraz tempa konsumpcji i zagęszczenia zooplanktonu) od zagęszczenia zooplanktonu (B) wyznaczone na podstawie najlepszego dopasowania do danych z eksperymentów rzeczywistych przeprowadzonych dla parametryzacji modelu (*Materiał i metody*, II.2.4.4), w których ryby żerowały na małej ofierze (6-dniowej *Artemia salina*, której masa odpowiada 0,5 dniowej - młodej - *D. longispina*, odpowiednio,  $2,64 \pm 0,42$  mg i  $2,50 \pm 0,58$  mg suchej masy) przy założeniu, że: (1) przebieg tych zależności jest zgodny z II typem odpowiedzi (wzór 9 i wzór 13 dla  $w(Y) = 1$ , *Materiał i metody* II.2.2) i jest taki sam dla ryby żerującej na osobnikach młodych i dojrzałych (jasnoniebieskie ciągłe linie), (2) przebieg tych zależności jest zgodny z III typem odpowiedzi (wzór 13, dla  $\gamma = 3,4158$  i  $n = 0,8465$ , Tabela 14), gdy ryba żeruje na młodej *Daphnia*\* (ciemnoniebieskie ciągłe linie), i (3) przebieg tych zależności jest zgodny z III typem odpowiedzi (wzór 13, dla  $\gamma = 0,0341$  i  $n = 0,8465$ ), gdy ryba żeruje na dojrzałych *Daphnia*\* (ciemnoniebieskie przerywane linie). Koła oznaczają oszacowane (na podstawie różnicy w początkowej i końcowej liczebności ofiar) wartości tempa konsumpcji i ryzyka śmierci w poszczególnych eksperymentach. **\*Wyjaśnienie pomocnicze:** ze względu na to, że w eksperymentach dla parametryzacji ryba żerowała na małej ofierze, wyniki te posłużyły najpierw do dopasowania wartości parametrów ( $\gamma$  i  $n$ ) dla ryby żerującej na młodych *Daphnia*, następnie wyznaczone zostały wartości parametrów funkcji dla ryby żerującej na osobnikach dojrzałych tj. wartość parametru  $n$  pozostała taka sama, natomiast wartość parametru  $\gamma$  została arbitralnie zmieniona (z  $\gamma_{juv} = 3,4158$  na  $\gamma_{ad} = 0,34158$ ), przyjmując założenie (zgodnie z rozumowaniem zawartym w pracy Gliwicz, Maszczyka, Jabłońskiego i Wrzosa 2013), że progowe zagęszczenie, przy którym ryba zaczyna żerować, jest niższe o dwa rzędy wielkości dla osobników dojrzałych, niż dla osobników młodych.





**Rys. 18.** Prędkość ryby (średnia  $\pm$  1SD) w trakcie przemieszczania się w poszukiwaniu dogodniejszego miejsca (ciemnoniebieskie słupki) i w trakcie żerowania (jasnoniebieskie słupki) podczas eksperymentu dla wyznaczenia ryzyka śmierci *per capita* ze strony ryby planktonożernej od zagęszczenia populacji zooplanktonu (*Materiał i metody*, II.2.4.4) w dwóch (z dziesięciu) losowo wybranych zbiornikach (I i II) jednego z bliźniaczych układów (układ A) dużego systemu eksperymentalnego dla badania zachowań pokarmowych ryb żerujących w dużej grupie (Rys. 12).

### III.2. Eksperymenty rzeczywiste dla weryfikacji prognoz modelowych oraz wyniki symulacji

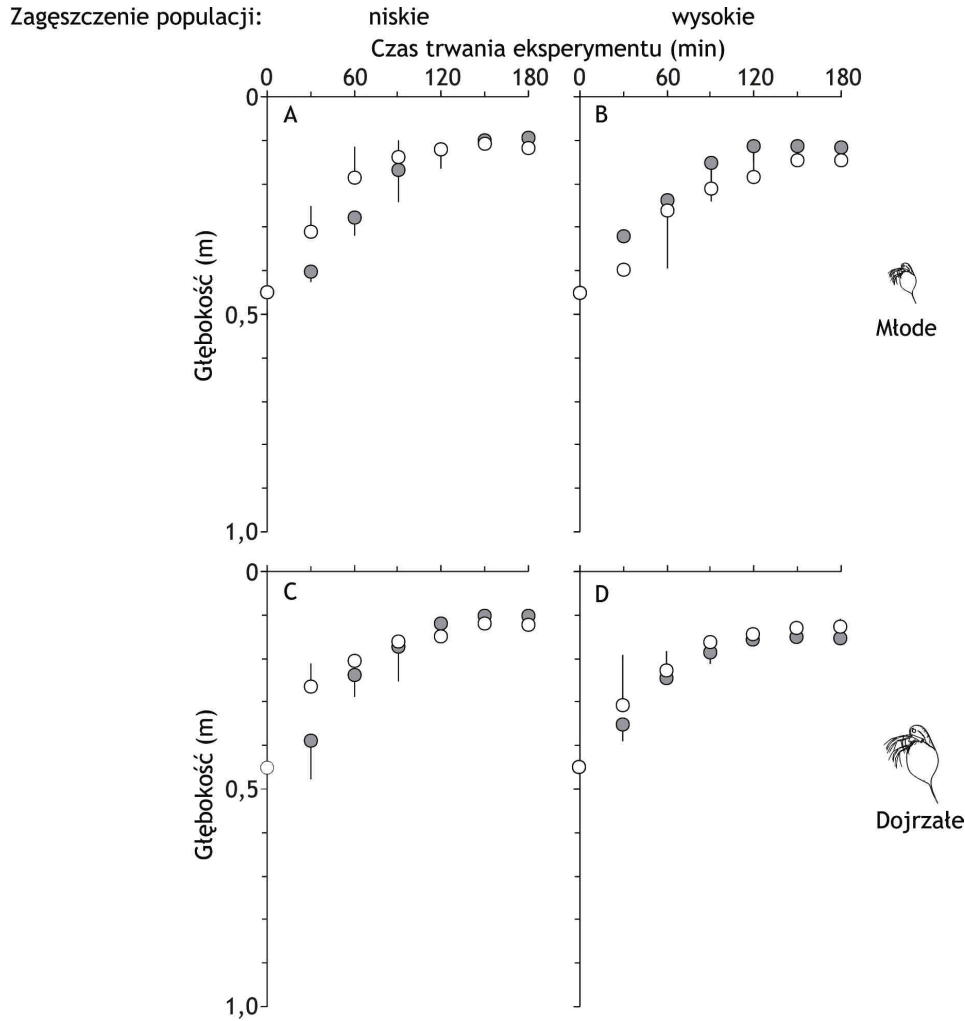
#### III.2.1. Eksperymenty rzeczywiste

Długość ciała 2,5 dniowej *Daphnia longispina* wprowadzanej do eksperymentów dla weryfikacji prognoz modelowych (średnia z 20 pomiarów, po 10 pomiarów dla dwóch eksperymentów) wynosiła  $0,678 \pm 0,057$  mm, natomiast długość ciała 5,5 dniowych osobników, również wprowadzonych do 2 eksperymentów dla weryfikacji prognoz modelowych (średnia z 20 pomiarów, po 10 pomiarów dla dwóch eksperymentów) wynosiła  $1,129 \pm 0,078$  mm.

Tylko w jednym z czterech wariantów (niskie zagęszczenie osobników młodocianych, Rys. 19A), w eksperymentach dla zbadania wpływu kierunkowego przepływu medium na rozmieszczenie *Daphnia* (*Materiał i metody*, II.2.5.2), czas dochodzenia do stanu równowagi (tj. czas, po którym nie zmieniało się już wyraźnie rozmieszczenie *Daphnia*) wyniósł  $150 (\pm 15)$  minut, natomiast w pozostałych trzech wariantach (Rys. 19B, C i D) równowaga ta ustalała się już w  $120 (\pm 15)$  minucie. Rozmieszczenie *Daphnia* w stanie równowagi (w

czasie między 120 i 180 minutą) w eksperymentach opisanych w rozdziale *Materiał i metody*, II.2.5.2, nie zależało istotnie ani od obecności (lub nieobecności) przepływu, ani od klasy wiekowej *Daphnia*, ani od kolumny, w której przebywały zwierzęta (L lub P), ani od zagęszczenia (niskie lub wysokie, przy  $P > 0,05$ , czteroczynnikowa ANOVA z powtórzeniami z testem *post-hoc* Tukey'a, Rys. 19).

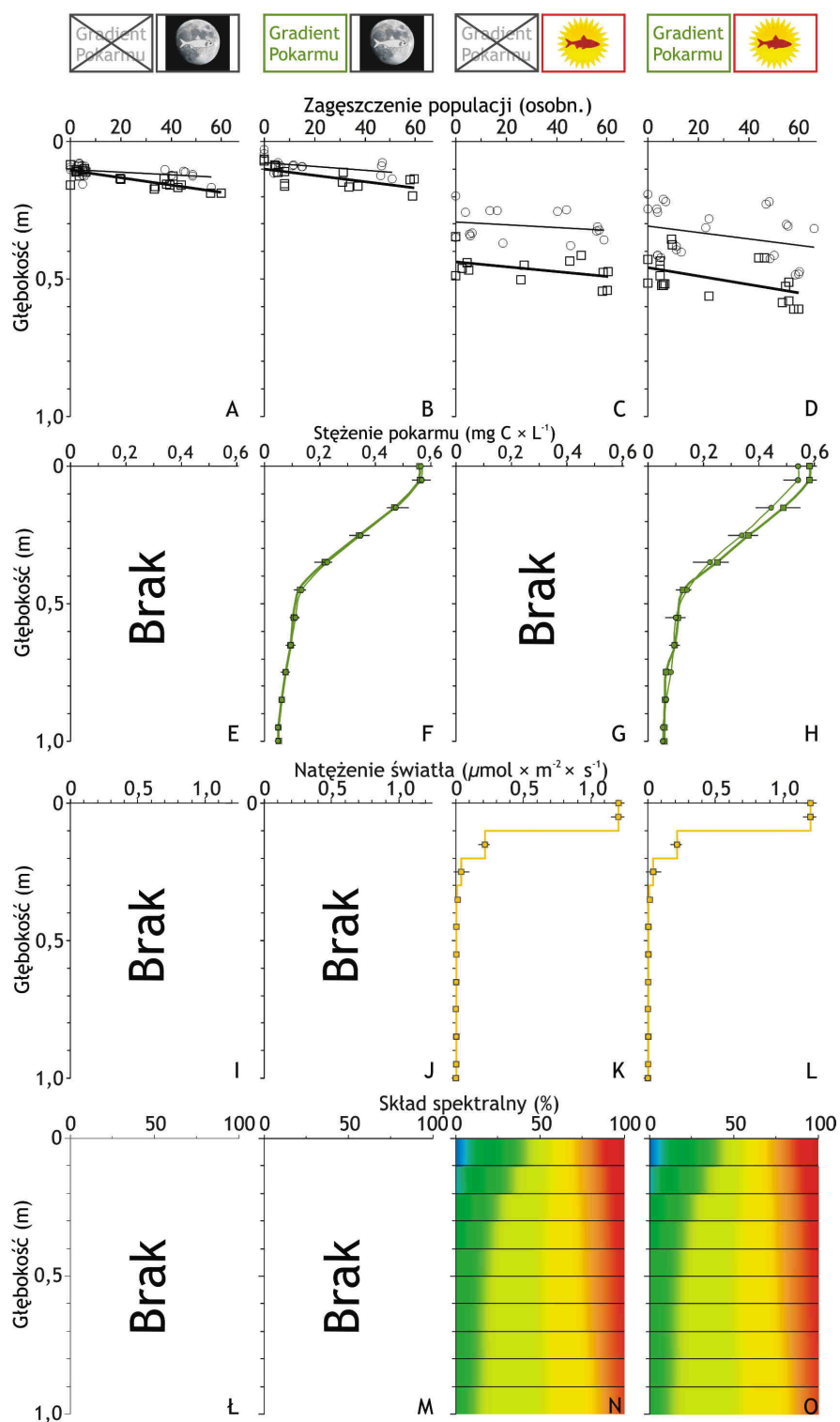
Rozmieszczenie *Daphnia* w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, Tabela 8a i 8b oraz *Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a, 9b i 9c) zależało istotnie od zagęszczenia jej populacji w 4 z 12 przeanalizowanych zestawów danych: (1) dla połączonych danych z eksperymentów przeprowadzonych na młodych i dojrzałych *Daphnia* w nieobecności któregośkolwiek gradientu, (2) dla połączonych danych z eksperymentów przeprowadzonych na młodych i dojrzałych *Daphnia* w gradiencie pokarmu, (3) dla połączonych danych z wariantów w nieobecności któregośkolwiek gradientu i w gradiencie pokarmu dla osobników dojrzałych oraz (4) dla połączonych danych z wariantów w gradiencie niebezpieczeństwa i w obydwu gradientach dla osobników dojrzałych (Tabela 15, istotność nachylenia regresji dla danych łącznie). W każdym z czterech przypadków, *Daphnia* w wyższych zagęszczeniach przebywały głębiej. O ile w pierwszych trzech przypadkach wynikać to może z silniejszych oddziaływań interferencyjnych między osobnikami w wyższych zagęszczeniach, o tyle w czwartym przypadku, może również wynikać z większego poczucia zagrożenia ze strony drapieżcy w wyższym zagęszczeniu. W żadnym z 12 porównań nie została wykazana istotna różnica w nachyleniu krzywych regresji między porównywanymi wariantami, co świadczyć może o tym, że efekt zagęszczenia jest podobny zarówno dla obydwu klas wiekowych (Tabela 15, pierwsze 4 porównania), jak również dla osobników należących do tej samej klasy wiekowej przebywających w różnych wariantach eksperymentalnych. W 6 na 12 porównań, *Daphnia* przebywały głębiej w jednym z dwóch wariantów (Tabela 15, porównanie *intercepts*) tj.: dojrzałe osobniki przebywały głębiej, niż osobniki młode, zarówno w gradiencie pokarmu, jak również w obydwu nakładających się na siebie gradientach; zarówno osobniki młode, jak i dojrzałe, przebywały głębiej w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie, niż w nieobecności któregośkolwiek gradientu; i zarówno osobniki młode, jak i dojrzałe, przebywały istotnie głębiej w obydwu nakładających się na siebie gradientach, niż w samym gradiencie pokarmu (Tabela 15, porównanie *intercepts*).



**Rys. 19.** Rozmieszczenie *Daphnia* młodych (A i B) i dojrzałych (C i D, średnia + lub - SD) w niskim (A i C) i w wysokim (B i D) zagęszczeniu ich populacji (w zakresie odpowiednio, 3,17-10,44 lub 39,39-63,72 osobn.  $\times L^{-1}$ ) w nieobecności (białe koła) lub w obecności (szare koła) przepływu w trakcie 180 minutowych eksperymentów przeprowadzonych dla zbadania wpływu kierunkowego przepływu mediów na rozmieszczenie *Daphnia* w nieobecności któregośkolwiek gradientu oraz dla wyznaczenia czasu niezbędnego dla ustalenia się równowagi dynamicznej w rozmieszczeniu (*Materiał i metody*, II.2.5.2, Tabela 7). Wartość każdego punktu jest średnią z trzech pomiarów.



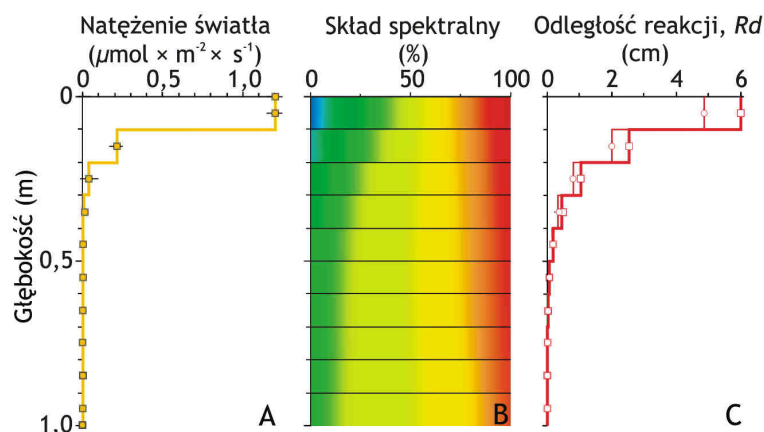
lub dojrzałe (kwadraty) w niskim (cienkie linie) lub w wysokim (linie pogrubione) zagęszczeniu swojej populacji przebywały przez pierwsze 120 minut (1 etap każdego eksperymentu) w nieobecności któregośkolwiek gradientu, następnie przez kolejne 120 minut (2 etap każdego eksperymentu) w nieobecności któregośkolwiek gradientu (A), w utworzonym przez 30 minut (między 120 i 150 minutą eksperymentu) gradiencie pokarmu (B), w stopniowo tworzącym się przez 120 minut (między 120 i 240 minutą eksperymentu) gradiencie światła (C, wyrażonym w % natężenia maksymalnego w górnym sektorze równym  $1,204 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ , między 0 i 100%) i w tworzących się obydwu tych gradientach (D) i w ostatnich 120 minutach (3 etap każdego eksperymentu) w warunkach odpowiadających jednemu z czterech wariantów eksperymentalnych: nieobecności któregośkolwiek gradientu (A), obecności jedynie gradientu pokarmu (B), obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy z maksymalnym natężeniem  $1,204 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  w górnym sektorze (C) i obecności obydwu tych gradientów (D). Pierwsze dwa etapy każdego eksperymentu pozwalały na ustabilizowanie się rozmieszczenia *Daphnia* w trakcie ostatniego etapu w warunkach właściwego wariantu eksperymentalnego.



**Rys. 21.** Rozmieszczenie *Daphnia* młodych (cienka linia i koła) i dojrzałych (pogrubiona linia i kwadraty) w różnym zagęszczeniu ich populacji w każdym z czterech wariantów eksperymentalnych (A, B, C i D) na tle przebiegu gradientów (w odpowiadających im kolumnach) w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, Tabela 8a i 8b oraz *Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a, 9b i 9c), przeprowadzonych we „właściwej wersji układu eksperymentalnego dla badania pionowego rozmieszczenia zooplanktonu” (*Materiał i metody*, II.2.3.4).

**Tabela 15.** Wyniki regresji liniowej ( $P$ ,  $F$ ,  $df$  i  $Error\ df$ ) dla 12 porównań rozmieszczenia *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji między parami wariantów w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, Tabela 8a i 8b oraz *Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a, 9b i 9c), przeprowadzonych we „właściwej wersji układu eksperymentalnego dla badania pionowego rozmieszczenia zooplanktonu” (*Materiał i metody*, II.2.3.4). Poziom istotności został ustalony po uwzględnieniu poprawki Bonferroniego ( $\alpha = 0,05/12 = 0,00417$ ) dla 12 porównań (różnice istotne zaznaczone pogrubioną czcionką)

Warianty	Nachylenie regresji dla danych łącznie	Porównanie	
	$P$ $F_{df;Edf}$	nachyleń $P$ $F_{df;Edf}$	<i>intercepts</i> $P$ $F_{df;Edf}$
Mł. vs dojrz. w nieobecności gradientów	<b>0,0019 13,29<sub>1;19</sub></b>	0,2212 1,62 <sub>1;16</sub>	0,0351 5,25 <sub>1;17</sub>
Mł. vs dojrz. w gradiencie pokarmu	<b>0,0029 13,21<sub>1;19</sub></b>	0,3237 1,04 <sub>1;16</sub>	0,0465 4,62 <sub>1;17</sub>
Mł. vs dojrz. w gradiencie niebezpieczeństwa	0,3229 1,04 <sub>1;18</sub>	0,9880 0,00 <sub>1;15</sub>	<b>&lt; 0,0001 35,12<sub>1;16</sub></b>
Mł. vs dojrz. w obydwu gradientach	0,0364 5,00 <sub>1;22</sub>	0,2172 1,63 <sub>1;19</sub>	<b>&lt; 0,0029 11,54<sub>1;20</sub></b>
Mł. w nieobecności gradientów vs w gradiencie pokarmu	0,0163 7,02 <sub>1;19</sub>	0,8930 0,02 <sub>1;16</sub>	0,0497 4,46 <sub>1;17</sub>
Dojrz. w nieobecności gradientów vs w gradiencie pokarmu	<b>0,0031 13,02<sub>1;19</sub></b>	0,7401 0,11 <sub>1;16</sub>	0,2419 1,47 <sub>1;17</sub>
Mł. w nieobecności gradientów vs w gradiencie niebezpieczeństwa	0,2977 1,15 <sub>1;19</sub>	0,7713 0,09 <sub>1;16</sub>	<b>&lt; 0,0001 87,37<sub>1;17</sub></b>
Dojrz. w nieobecności gradientów vs w gradiencie niebezpieczeństwa	0,3243 1,03 <sub>1;18</sub>	0,7420 0,11 <sub>1;15</sub>	<b>&lt; 0,0001 98,20<sub>1;16</sub></b>
Mł. w gradiencie pokarmu vs w obydwu gradientach	0,1339 2,44 <sub>1;21</sub>	0,6781 0,18 <sub>1;18</sub>	<b>&lt; 0,0001 49,98<sub>1;19</sub></b>
Dojrz. w gradiencie pokarmu vs w obydwu gradientach	0,4519 0,59 <sub>1;20</sub>	0,9518 0,00 <sub>1;17</sub>	<b>&lt; 0,0001 86,20<sub>1;18</sub></b>
Mł. w gradiencie niebezpieczeństwa vs w obydwu gradientach	0,1293 2,50 <sub>1;21</sub>	0,7669 0,09 <sub>1;18</sub>	0,6293 0,24 <sub>1;19</sub>
Dojrz. w gradiencie niebezpieczeństwa vs w obydwu gradientach	<b>0,0035 11,28<sub>1;19</sub></b>	0,6468 0,22 <sub>1;16</sub>	0,8582 0,03 <sub>1;17</sub>



**Rys. 22.** Natężenie światła (średnia  $\pm$  SD, A) i skład spektralny (B) w każdym z 10 sektorów właściwej (trzeciej) wersji układu eksperymentalnego dla badania rozmieszczenia zooplanktonu (*Materiał i metody*, II.2.3.4) w wariantach z gradientem światła (w obecności i w nieobecności gradientu pokarmu) w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.6) oraz zmiany przewidywanej odległości reakcji ryby planktonożernej względem młodej i dojrzałej *Daphnia longispina* wraz z głębokością w tym układzie (C, odpowiednio, cienka i pogrubiona linia), wyznaczone poprzez podstawienie danych natężenia i składu spektralnego światła charakterystycznego dla każdego sektora do wzoru 12 (*Materiał i metody*, II.2.2). Wartości natężenia światła i składu spektralnego dla każdego sektora są średnią z 4 pomiarów – po jednym pomiarze dla każdej z kolumn w dwóch eksperymentach (jednym w obecności i drugim w nieobecności gradientu pokarmu).

**Tabela 16.** Natężenie światła trzech zakresów ( $E_c$ ) 358-540, 540-655 i 655-880 nm odpowiadającym kolorom niebieskiemu, zielonemu i czerwonemu w każdym z 10 sektorów właściwego (trzeciego) układu dla badania pionowego rozmieszczenia zooplanktonu podczas eksperymentów dla weryfikacji prognoz modelowych zmierzonych za pomocą spektrofotometru światłowodowego *USB2000 UV-VIS*

# sektora	Głębokość (m)	Natężenie światła ( $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ )		
		Zakres spektrum (nm)		
		358-540	540-655	655-880
1	0-0,10	0,2911	0,7646	0,1472
2	0,10-0,20	0,0221	0,1784	0,0161
3	0,20-0,30	0,0021	0,0340	0,0030
4	0,30-0,40	0,0002	0,0064	0,0003
5	0,40-0,50	$1,52 \times 10^5$	0,0012	$3,79 \times 10^5$
6	0,50-0,60	$1,79 \times 10^6$	0,0003	$7,15 \times 10^6$
7	0,60-0,70	$3,85 \times 10^7$	$6,88 \times 10^5$	$1,31 \times 10^6$
8	0,70-0,80	$8,67 \times 10^8$	$1,99 \times 10^5$	$1,52 \times 10^7$
9	0,80-0,90	$8,67 \times 10^8$	$1,99 \times 10^5$	$1,52 \times 10^7$
10	0,90-1,00	$8,11 \times 10^8$	$1,94 \times 10^5$	$1,54 \times 10^7$



### III.2.2. Porównanie prognoz modelowych z wynikami z eksperymentów rzeczywistych

Pionowe rozmieszczenie *Daphnia*, zarówno osobników młodych (Rys. 25 i 26), jak i dojrzałych (Rys. 27 i 28), w eksperymentach wirtualnych powstałych wskutek symulacji (niebieskie pola), zarówno w niskim (Rys. 25 i 27 A, E, I, M), jak i w wysokim (Rys. 26 i 28 A, E, I, M) zagęszczeniu populacji było równomierne w nieobecności któregośkolwiek gradientu, co wynikało z założenia przyjętego podczas konstrukcji modelu, popartego wynikami z eksperymentów dla parametryzacji modelu, że osobniki unikają interferencji (konkurencji o miejsce) z innymi osobnikami. W samym gradiencie pokarmu (z maksimum jego stężenia w warstwach przypowierzchniowych), osobniki wirtualne wybierały głębokości bliżej powierzchni, w których mogły mieć wyższe tempo wzrostu, z tym, że przebywały głębiej w wyższych zagęszczeniach ich populacji (Rys. 23 i 24), co wynikało, z jednej strony, z potrzeby przebywania na głębokościach z wysokim stężeniem pokarmu, a z drugiej strony, z potrzeby unikania oddziaływań interferencyjnych z innymi osobnikami. W wersji założeń modelowych z *Daphnia* popełniającą błędy przy szacowaniu stężenia pokarmu (Rys. 25-28 panele J, N), rozmieszczenie było bardziej równomierne, niż w przypadku scenariusza założeń z *Daphnia* „bezbłędną”, w którym większość osobników wybierała sektor przy powierzchni, z najwyższym stężeniem pokarmu (Rys. 25-28 B, F). Wpływ błędu na rozmieszczenie był wyraźniejszy u młodych osobników, niż u dojrzałych (Rys. 25-28 B, F, J, N). W samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy, osobniki wirtualne przebywały głębiej, niż w wariancie w nieobecności któregośkolwiek gradientu (Rys. 23 i 24). Nie było wyraźnej różnicy w rozmieszczeniu młodych i dojrzałych przy założeniu II typu odpowiedzi, natomiast różnica się nieznacznie zwiększała przy założeniu typu III (Rys. 23 i 24). W scenariuszu założeń z II typem odpowiedzi funkcjonalnej, *Daphnia* przebywały głębiej w słupie wody, niż w scenariuszu z III typem. O ile przy II typie odpowiedzi *Daphnia* przebywały głębiej przy niskim zagęszczeniu populacji, o tyle przy III typie przebywały głębiej w zagęszczeniach wysokich (Rys. 23 i 24 C, G, K, O). Założenie błędnego szacowania natężenia światła nie wpływało wyraźnie na średnią głębokość, ani na kształt rozkładów (Rys. 25-28 C, G, K, O). W obydwu gradientach, wirtualne *Daphnia* przebywały głębiej niż w wariancie z samym gradientem pokarmu, ale bliżej powierzchni, niż w obecności samego gradientu informacji o niebezpieczeństwie (Rys. 23 i 24). Była wyraźniejsza różnica w głębokości wybieranej przez osobniki należące do różnych klas wiekowych, niż w samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie, *Daphnia* dojrzałe przebywały głębiej, niż osobniki młode (Rys. 23 i 24 D, H, L, P). Podobnie jak w wariancie z samym gradientem informacji, również w obydwu gradientach *Daphnia* (zarówno młode, jak

i dojrzałe) przebywały głębiej w słupie wody w scenariuszu przewidującym II, niż III typ odpowiedzi funkcjonalnej. O ile przy II typie odpowiedzi przebywały głębiej w niższych zagęszczeniach populacji, o tyle przy III typie przebywały głębiej w zagęszczeniach wyższych (Rys. 23 i 24 D, H, L, P). Przy założeniu błędnego szacowania natężenia światła, osobniki przebywały głębiej w słupie wody (Rys. 23 i 24 D, H, L, P). Założenie „błędnej *Daphnia*” wpływało wyraźnie na rozmieszczenie, szczególnie przy II typie, co wynikało z większego wpływu błędu w szacowaniu stężenia pokarmu, niż w szacowaniu natężenia światła (Rys. 25-28 D, H, L, P). Rozmieszczenie było bardziej równomierne przy założeniu „błędnej *Daphnia*”, niż „bezbłędnej” oraz przy założeniu III niż II typu odpowiedzi (Rys. 25-28 D, H, L, P).

W nieobecności któregośkolwiek gradientu, głębokość wybierana zarówno przez osobniki młode, jak i dojrzałe, była większa w symulacjach, niż w eksperymentach rzeczywistych (istotnie różne *intercepts*, Tabela 17 i 18; Rys. 23 i 24 A, E, I, M). Efekt zagęszczenia był różny dla dojrzałych osobników (istotne różnice w nachyleniu krzywych regresji, Tabela 18), ale nie dla osobników młodych (Tabela 17). O ile w symulacjach rozmieszczenie było równomierne (duże odchylenie standardowe od średniej głębokości), o tyle w eksperymentach rzeczywistych większość osobników była skupiona w sektorze najbliższej powierzchni (Rys. 25-28 A, E, I, M, relatywnie małe odchylenie standardowe).

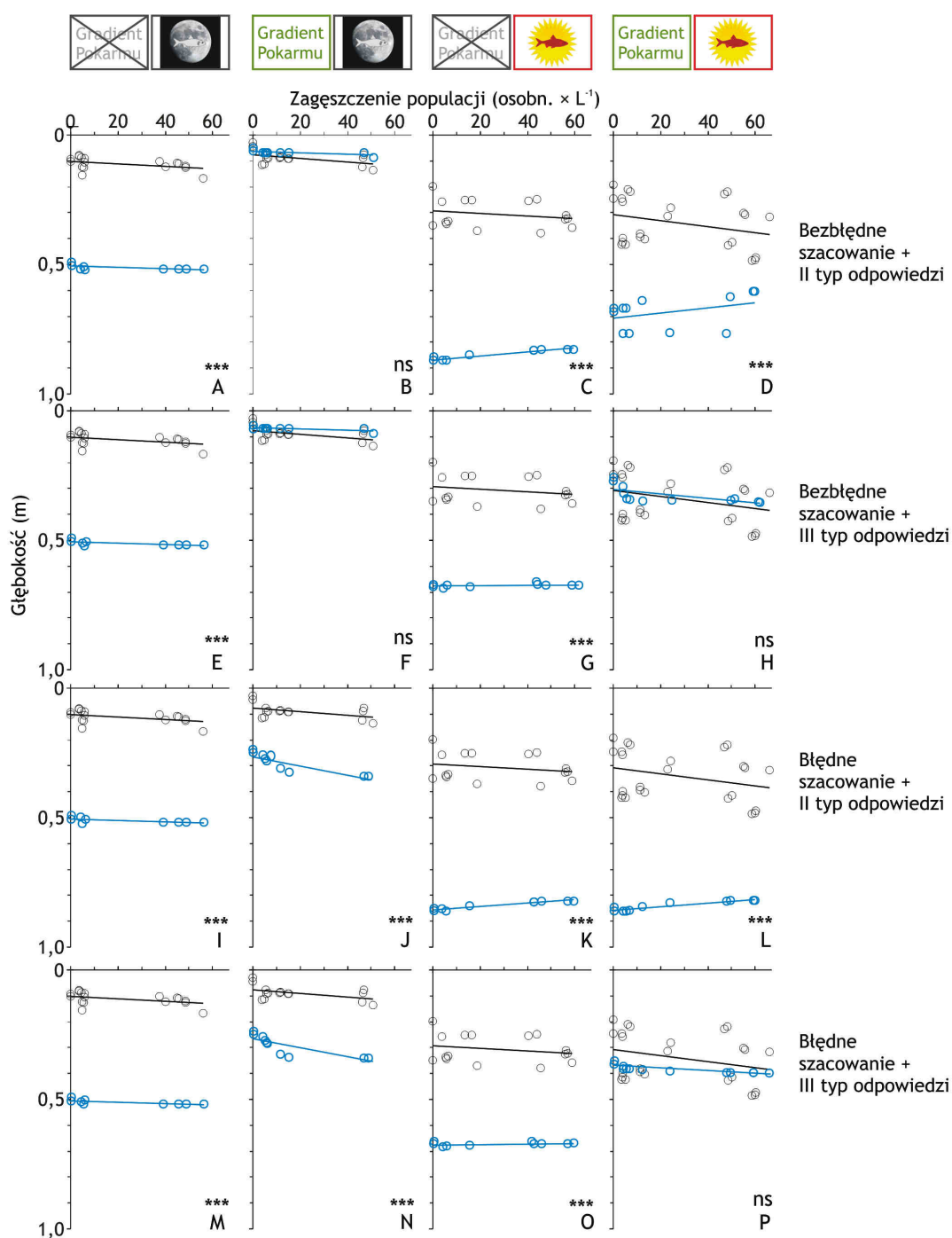
W samym gradiencie pokarmu, nie było istotnych różnic w głębokości wybieranej przez osobniki dojrzałe w symulacjach i w eksperymentach rzeczywistych, ani w scenariuszu z „bezbłędą *Daphnia*”, ani w scenariuszu z *Daphnia* popełniającą błędy przy szacowaniu stężenia pokarmu (brak istotnych różnic w *intercepts*, Tabela 18; Rys. 24 B, F, J, N). Większość osobników gromadziła się w górnym sektorze (relatywnie małe odchylenie standardowe dla rozkładów, Rys. 25-28). Głębokość wybierana przez osobniki młode nie różniła się istotnie między eksperymentami rzeczywistymi i symulacjami jedynie w scenariuszu założeń z „bezbłędą *Daphnia*” (Tabela 17; Rys. 23 B i F). Natomiast w scenariuszu z *Daphnia* popełniającą błędy, młode osobniki przebywały istotnie bliżej powierzchni w eksperymencie rzeczywistym, niż w symulacjach (istotne różnice w *intercepts*, Tabela 17; Rys. 23 J i N). W scenariuszu z *Daphnia* popełniającą błędy, rozmieszczenie osobników młodych w symulacjach było bardziej równomierne, niż w eksperymencie rzeczywistym (relatywnie większe odchylenie standardowe od średniej głębokości, Rys. 25 i 26 J i N). Efekt zagęszczenia w symulacjach i w eksperymentach rzeczywistych był podobny, zarówno dla osobników dojrzałych, jak również dla osobników młodych, w każdym z dwóch

scenariuszy modelowych (nieistotne różnice w nachyleniu krzywych regresji, Tabela 17 i 18; Rys. 23 i 24 B, F, J, N).

W samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy, zarówno osobniki młode, jak i dojrzałe, wybierały istotnie większe głębokości w symulacjach, niż w eksperymentach rzeczywistych w każdym z czterech scenariuszy modelowych z tym, że różnica ta była nieznacznie mniejsza dla scenariusza z III, niż z II typem odpowiedzi (istotne różnice w *intercepts*, Tabela 17 i 18; Rys. 23 C, G, K, O). W żadnym ze scenariuszy, ani dla osobników młodych, ani dla dojrzałych, nie było istotnej różnicy w efekcie zagęszczenia między głębokością wybieraną przez osobniki wirtualne i osobniki w eksperymentach rzeczywistych (nieistotne różnice w nachyleniu krzywych regresji, Tabela 17 i 18). O ile rozmieszczenie w eksperymentach rzeczywistych było bardziej równomierne w eksperymentach rzeczywistych, niż w symulacjach wynikających ze scenariusza z uwzględnieniem II typu odpowiedzi (większe odchylenia standardowe od średniej głębokości, Rys. 25-28 C, K), o tyle kształty rozkładów wynikające ze scenariusza uwzględniającego III typ były podobne do rozkładów z eksperymentów rzeczywistych, przynajmniej pod względem odchylenia standardowego od średniej (Rys. 25-28 G, O).

W obydwu nakładających się na siebie gradientach, zarówno osobniki młode, jak również osobniki dojrzałe, wybierały większe głębokości w symulacjach, niż w eksperymentach rzeczywistych w scenariuszu założeń zakładającym II typ odpowiedzi funkcjonalnej (istotne różnice w *intercepts*, Tabela 17 i 18, Rys. 23 i 24 D, L). Było tak zarówno dla scenariusza z „*Daphnia* bezbłędną” (Rys. 23 i 24 D), jak również dla scenariusza z *Daphnia* popełniającą błędy w szacowaniu stężenia pokarmu i w szacowaniu natężenia światła (Rys. 23 i 24 L). Nie było natomiast istotnych różnic w wyborze głębokości w symulacjach i w eksperymentach rzeczywistych w scenariuszu założeń zakładającym III typ odpowiedzi (Rys. 23 i 24 H, P). W żadnym ze scenariuszy założeń, ani dla osobników młodych, ani dla dojrzałych, nie było istotnej różnicy w efekcie zagęszczenia między głębokością wybieraną przez osobniki wirtualne i osobniki w eksperymentach rzeczywistych (nieistotne różnice w nachyleniu krzywych regresji, Tabela 17 i 18). Rozmieszczenie, zarówno osobników młodych, jak i dojrzałych, było bardziej równomierne w eksperymentach rzeczywistych, niż w symulacjach wynikających ze scenariusza z uwzględnieniem II typu odpowiedzi, zarówno dla „*Daphnia* bezbłędnych” (większe odchylenia standardowe od średniej głębokości, Rys. 25-28 D), jak również dla *Daphnia* popełniających błędy (Rys. 25-28 L). Rozmieszczenie dla obydwu klas wiekowych było również bardziej równomierne w eksperymentach rzeczywistych, niż w symulacjach wynikających ze scenariusza z uwzględnieniem III typu odpowiedzi, ale tylko

dla „*Daphnia* bezbłędnych” (Rys. 25-28 H). Natomiast, kształty rozkładów wynikające ze scenariusza uwzględniającego III typ odpowiedzi oraz uwzględniającego założenie, że *Daphnia* popełniają błędy przy szacowaniu stężenia pokarmu i natężenia światła (Rys. 25-28 P), były podobne do rozkładów z eksperymentów rzeczywistych, przynajmniej pod względem odchylenia standardowego od średniej (Rys. 25-28 P).

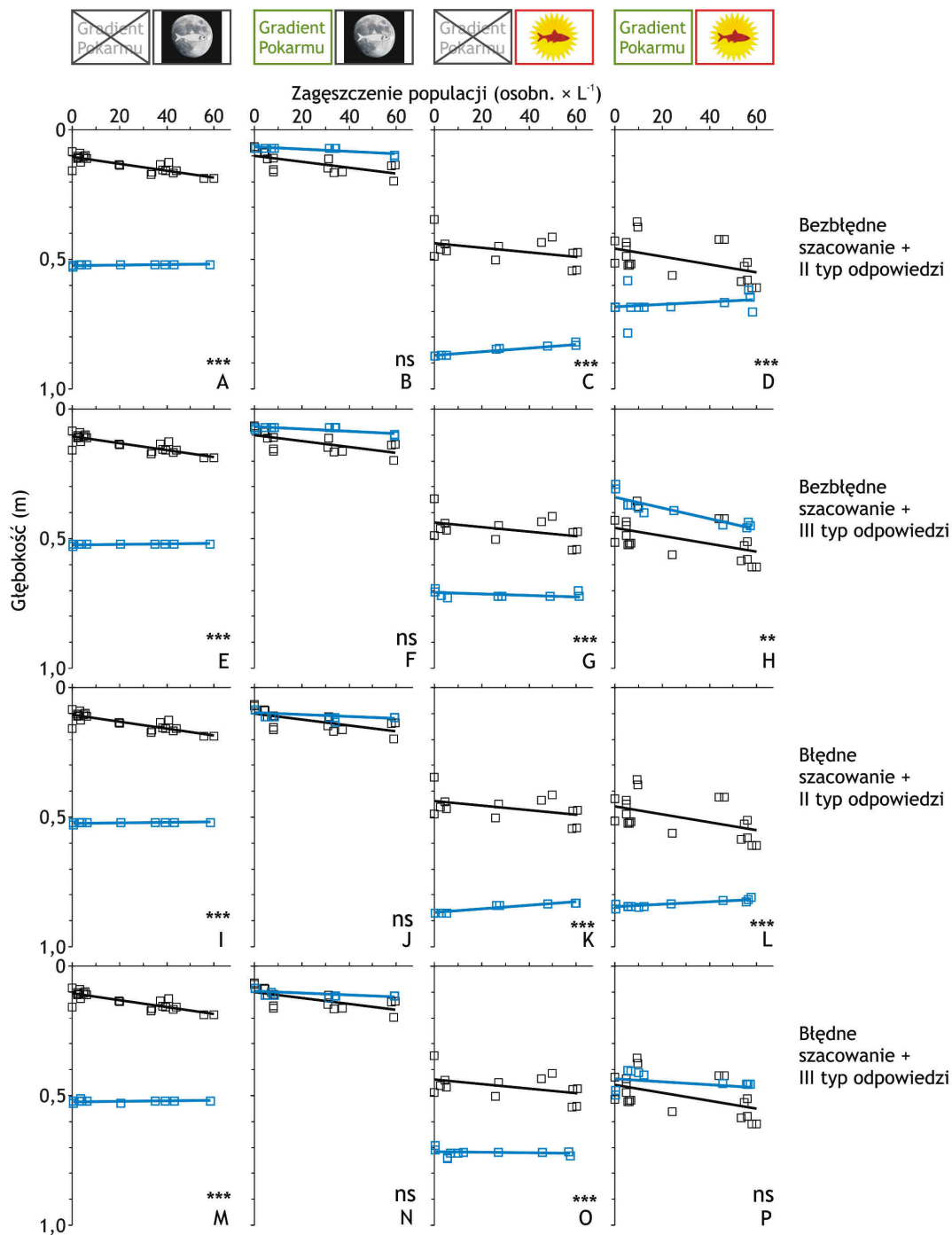


**Rys. 23.** Rozmieszczenie młodych (2,5 dniowych) *Daphnia* w różnym zagęszczeniu populacji (średnie głębokości) w jednym z czterech wariantów eksperymentalnych: (1) w nieobecności

gradientu pokarmu glonowego i w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (A, E, I, M), (2) w obecności jedynie gradientu pokarmu (B, F, J, N), (3) w obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie (C, G, K, O), i (4) w nakładających się na siebie obydwu gradientach (D, H, L, P), w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, 2.5.2 i *Materiał i metody* 2.5.4; czarne koła – średnie dla każdego eksperymentu, czarna linia – linia trendu) na tle wyników z eksperymentów wirtualnych powstałych wskutek symulacji w tych samych zagęszczeniach populacji (niebieskie koła – średnie dla każdego eksperymentu, niebieska linia – linia trendu) dla każdego z 4 scenariuszy założeń modelu optymalizacyjnego: (1) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi funkcjonalnej Hollinga (A, B, C, D), (2) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (E, F, G, H), (3) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu (a tym samym tempa wzrostu), jak również, natężenia światła (a tym samym ryzyka śmierci), a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi (I, J, K, L) i (4) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu, jak również, natężenia światła, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (M, N, O, P). Istotne statystycznie różnice w *intercepts* pokazane jako: \*\* dla  $P < 0,0013$  i \*\*\* dla  $P < 0,00013$ , nieistotne różnice jako ns. O ile na wykresach liczba punktów dla wyników z eksperymentów rzeczywistych jest dwa razy większa, niż liczba punktów z symulacji, ponieważ dla każdego eksperymentu rzeczywistego pokazane zostały wyniki dla dwóch pomiarów, o tyle w analizie statystycznej porównywana była ta sama liczba punktów (po jednej średniej dla każdego eksperymentu). Szczegółowa statystyka w tabeli 18. Szczegółowa statystyka w Tabeli 17.

**Tabela 17.** Porównanie (nachylenia i *intercepts*) linii regresji (*P*, *F*, *df* i *Error df*) obrazującej zmiany pionowego rozmieszczenia młodych *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji w symulacjach (*Materiał i metody*, II.2.6) z linią regresji obrazującą rozmieszczenie młodych *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, Tabela 8a i 8b oraz *Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a, 9b i 9c), przeprowadzonych we „właściwej wersji układu eksperymentalnego dla badania pionowego rozmieszczenia zooplanktonu” (*Materiał i metody*, II.2.3.4) w każdym z 16 scenariuszy będących kombinacją 4 wariantów eksperymentalnych i 4 scenariuszy założeń modelowych, Rys. 23). Ze względu na to, że porównywane były wyniki z 4 scenariuszy założeń pod względem ich dopasowania do wyników z eksperymentów rzeczywistych dla każdego wariantu z osobna, poziom istotności został ustalony po uwzględnieniu poprawki Bonferroniego dla 4 porównań ( $\alpha = 0,05/4 = 0,00125$ , różnice istotne zaznaczone pogrubioną czcionką)

Scenariusz założeń	Wariant porównanie	Brak gradientów	Gradient pokarmu	Gradient niebezpieczeństwa	Obydwa gradienty
		<i>P</i> <i>F</i> <sub>df;Edf</sub>	<i>P</i> <i>F</i> <sub>df;Edf</sub>	<i>P</i> <i>F</i> <sub>df;Edf</sub>	<i>P</i> <i>F</i> <sub>df;Edf</sub>
Bezbłędne II typ	nachylenie	0,1543 2,3 <sub>1;14</sub>	0,1704 2,1 <sub>1;16</sub>	0,0712 9,5 <sub>1;16</sub>	0,0859 3,3 <sub>1;20</sub>
	<i>intercept</i>	<b>&lt; 0,0001 925,8<sub>1;19</sub></b>	0,0921 3,2 <sub>1;17</sub>	<b>&lt; 0,0001 244,7<sub>1;17</sub></b>	<b>&lt; 0,0001 88,9<sub>1;21</sub></b>
Bezbłędne III typ	nachylenie	0,0900 3,3 <sub>1;14</sub>	0,1922 2,0 <sub>1;16</sub>	0,0258 6,0 <sub>1;16</sub>	0,6041 0,3 <sub>1;20</sub>
	<i>intercept</i>	<b>&lt; 0,0001 990,3<sub>1;15</sub></b>	0,1166 2,2 <sub>1;17</sub>	<b>&lt; 0,0001 127,1<sub>1;17</sub></b>	0,9311 0,0 <sub>1;21</sub>
Błędne II typ	nachylenie	0,0132 8,3 <sub>1;14</sub>	0,6105 0,3 <sub>1;16</sub>	0,0070 9,6 <sub>1;16</sub>	0,0794 3,4 <sub>1;20</sub>
	<i>intercept</i>	<b>&lt; 0,0001 690,4<sub>1;15</sub></b>	<b>&lt; 0,0001 141,8<sub>1;17</sub></b>	<b>&lt; 0,0001 241,5<sub>1;17</sub></b>	<b>&lt; 0,0001 247,1<sub>1;21</sub></b>
Błędne III typ	nachylenie	0,0295 5,4 <sub>1;14</sub>	0,6950 0,3 <sub>1;16</sub>	0,0243 6,2 <sub>1;16</sub>	0,3243 1,0 <sub>1;20</sub>
	<i>intercept</i>	<b>&lt; 0,0001 714,5<sub>1;15</sub></b>	<b>&lt; 0,0001 130,9<sub>1;17</sub></b>	<b>&lt; 0,0001 127,3<sub>1;17</sub></b>	0,0847 3,3 <sub>1;21</sub>



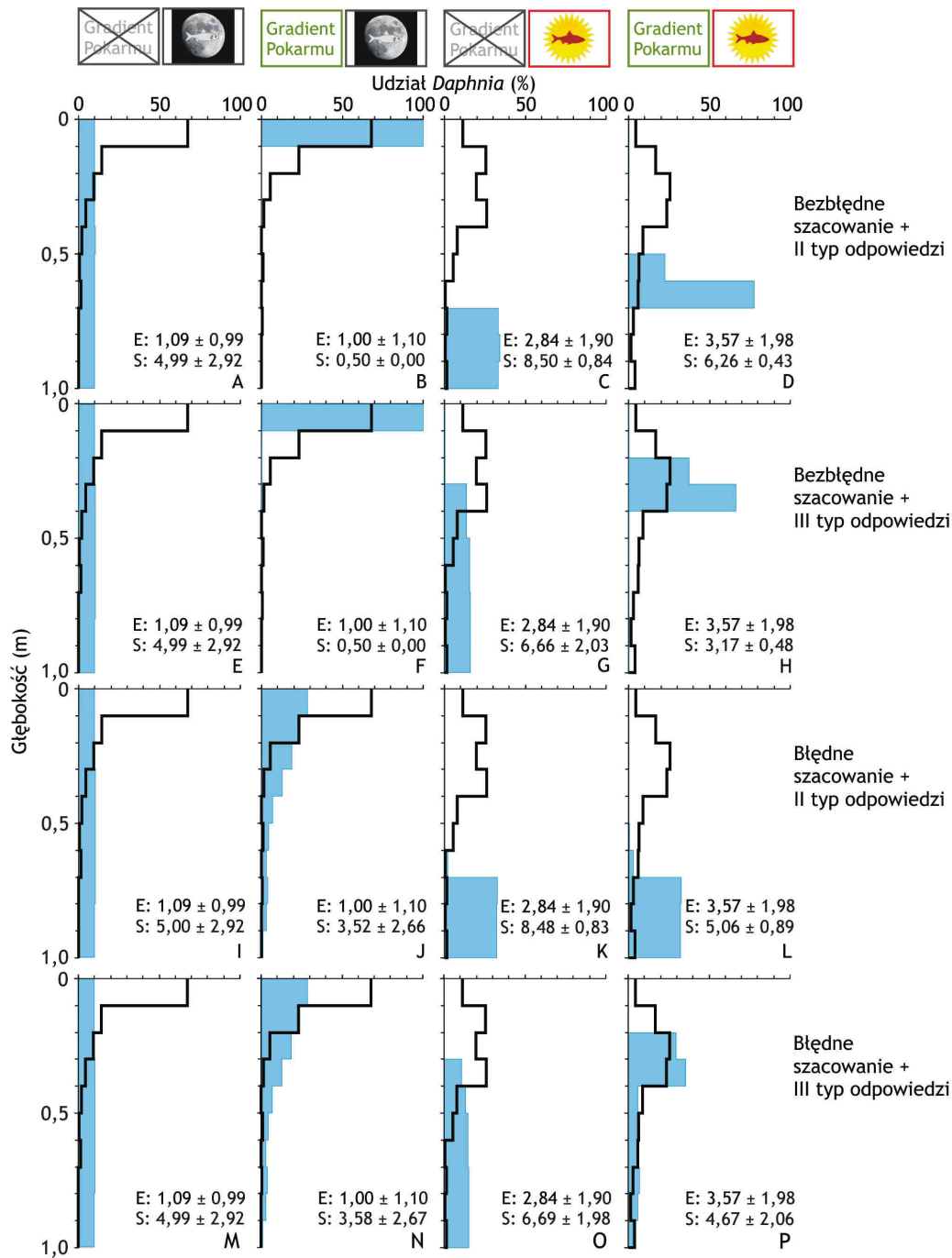
**Rys. 24.** Rozmieszczenie dojrzałych (5,5 dniowych) *Daphnia* w różnym zagęszczeniu populacji (średnie głębokości) w jednym z czterech wariantów eksperymentalnych: (1) w nieobecności gradientu pokarmu glonowego i w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (A, E, I, M), (2) w obecności jedynie gradientu pokarmu (B, F, J, N), (3) w obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie (C, G, K, O), i (4) w nakładających się na siebie obydwu gradientach (D, H, L, P), w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, 2.5.2 i *Materiał i metody* 2.5.4; czarne koła – średnie dla każdego eksperymentu, czarna linia – linia trendu) na tle wyników z eksperymentów wirtualnych powstałych wskutek symulacji w tych samych zagęszczeniach populacji (niebieskie koła – średnie dla każdego

eksperymentu, niebieska linia – linia trendu) dla każdego z 4 scenariuszy założeń modelu optymalizacyjnego: (1) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi funkcjonalnej Hollinga (A, B, C, D), (2) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (E, F, G, H), (3) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu (a tym samym tempa wzrostu), jak również, natężenia światła (a tym samym ryzyka śmierci), a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi (I, J, K, L) i (4) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu, jak również, natężenia światła, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (M, N, O, P). Istotne statystycznie różnice w *intercepts* pokazane jako \*\* dla  $P < 0,0013$  i \*\*\* dla  $P < 0,00013$ , nieistotne różnice jako ns. O ile na wykresach liczba punktów dla wyników z eksperymentów rzeczywistych jest dwa razy większa, niż liczba punktów z symulacji, ponieważ dla każdego eksperymentu rzeczywistego pokazane zostały wyniki dla dwóch pomiarów, o tyle w analizie statystycznej porównywana była ta sama liczba punktów (po jednej średniej dla każdego eksperymentu). Szczegółowa statystyka w tabeli 18.



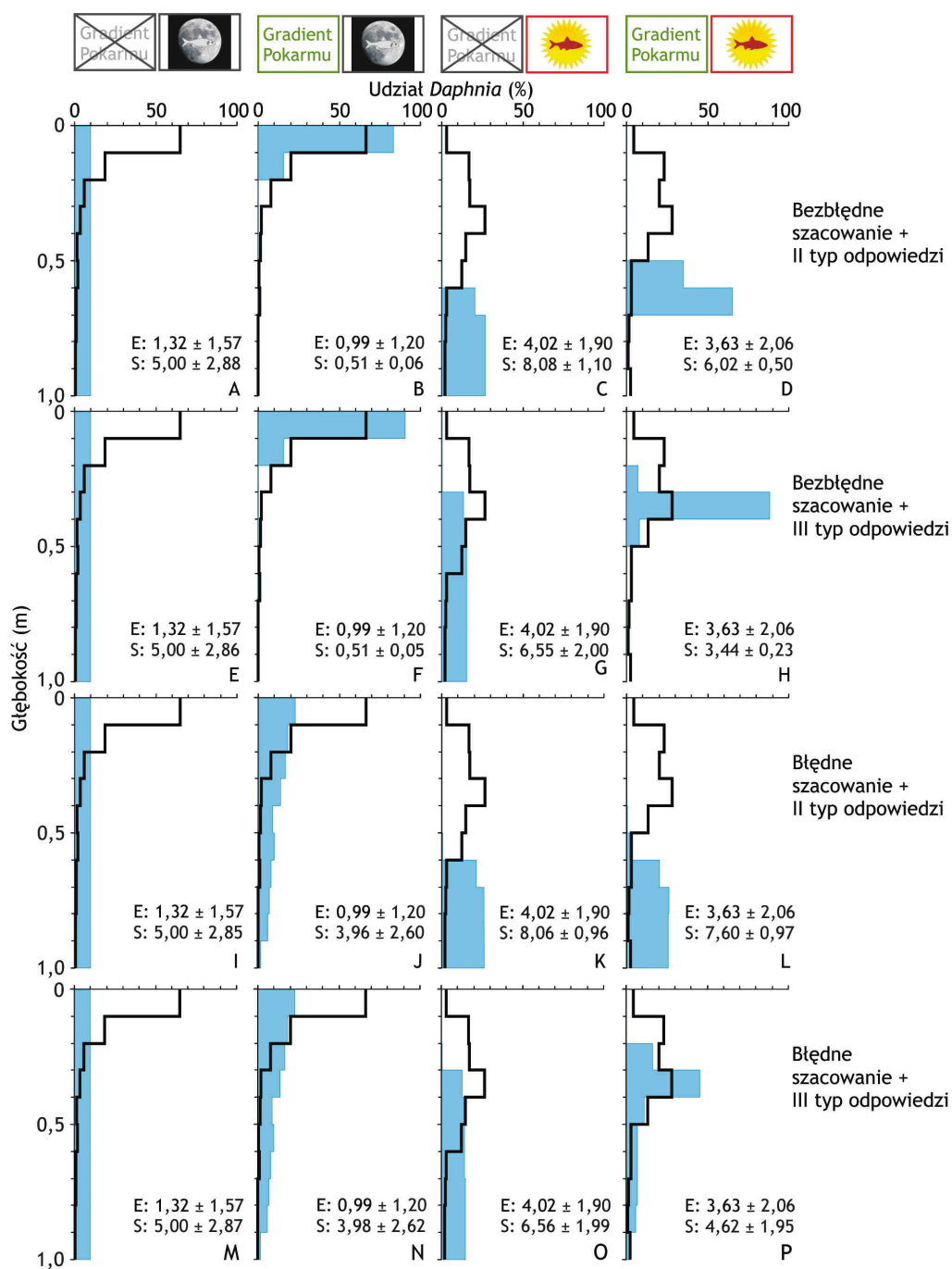
**Tabela 18.** Porównanie (nachylenia i *intercepts*) linii regresji (*P*, *F*, *df* i *Error df*) obrazującej zmiany pionowego rozmieszczenia dojrzałych *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji w symulacjach (*Materiał i metody*, II.2.6) z linią regresji obrazującą rozmieszczenie młodych *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, Tabela 8a i 8b oraz *Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a, 9b i 9c), przeprowadzonych we „właściwej wersji układu eksperymentalnego dla badania pionowego rozmieszczenia zooplanktonu” (*Materiał i metody*, II.2.3.4) w każdym z 16 scenariuszy będących kombinacją 4 wariantów eksperymentalnych i 4 scenariuszy założeń modelowych, Rys. 24). Ze względu na to, że porównywane były wyniki z 4 scenariuszy założeń pod względem ich dopasowania do wyników z eksperymentów rzeczywistych dla każdego wariantu z osobna, poziom istotności został ustalony po uwzględnieniu poprawki Bonferroniego dla 4 porównań ( $\alpha = 0,05/4 = 0,0125$ , różnice istotne zaznaczone pogrubioną czcionką)

Scenariusz założeń	Wariant	Brak gradientów	Gradient pokarmu	Gradient niebezpieczeństwa	Obydwa gradienty
	porównanie	<i>P</i> <i>F</i> <sub>df;Edf</sub>	<i>P</i> <i>F</i> <sub>df;Edf</sub>	<i>P</i> <i>F</i> <sub>df;Edf</sub>	<i>P</i> <i>F</i> <sub>df;Edf</sub>
Bez błędne II typ	nachylenie	<b>0,0007 16,6<sub>1;14</sub></b>	0,0344 5,5 <sub>1;16</sub>	0,0325 5,6 <sub>1;14</sub>	0,0054 9,9 <sub>1;18</sub>
	<i>intercept</i>	<b>&lt; 0,0001 998,8<sub>1;19</sub></b>	0,0179 6,9 <sub>1;17</sub>	<b>&lt; 0,0001 369,2<sub>1;15</sub></b>	<b>&lt; 0,0001 46,5<sub>1;19</sub></b>
Bez błędne III typ	nachylenie	<b>&lt; 0,0001 31,4<sub>1;18</sub></b>	0,0224 5,4 <sub>1;16</sub>	0,3182 1,1 <sub>1;14</sub>	0,9191 0,0 <sub>1;18</sub>
	<i>intercept</i>	<b>&lt; 0,0001 960,2<sub>1;19</sub></b>	0,0172 7,0 <sub>1;17</sub>	<b>&lt; 0,0001 197,0<sub>1;15</sub></b>	<b>0,0003 24,0<sub>1;21</sub></b>
Błędne II typ	nachylenie	<b>0,0002 22,2<sub>1;18</sub></b>	0,0247 6,1 <sub>1;16</sub>	0,0353 5,4 <sub>1;14</sub>	0,0097 8,4 <sub>1;18</sub>
	<i>intercept</i>	<b>&lt; 0,0001 929,4<sub>1;19</sub></b>	0,0969 3,1 <sub>1;17</sub>	<b>&lt; 0,0001 366,7<sub>1;15</sub></b>	<b>&lt; 0,0001 210,9<sub>1;19</sub></b>
Błędne III typ	nachylenie	<b>&lt; 0,0001 31,4<sub>1;18</sub></b>	0,0266 6,1 <sub>1;16</sub>	0,2397 1,51 <sub>1;14</sub>	0,0948 3,1 <sub>1;18</sub>
	<i>intercept</i>	<b>&lt; 0,0001 954,3<sub>1;19</sub></b>	0,1013 2,9 <sub>1;17</sub>	<b>&lt; 0,0001 184,8<sub>1;15</sub></b>	0,0465 4,5 <sub>1;19</sub>



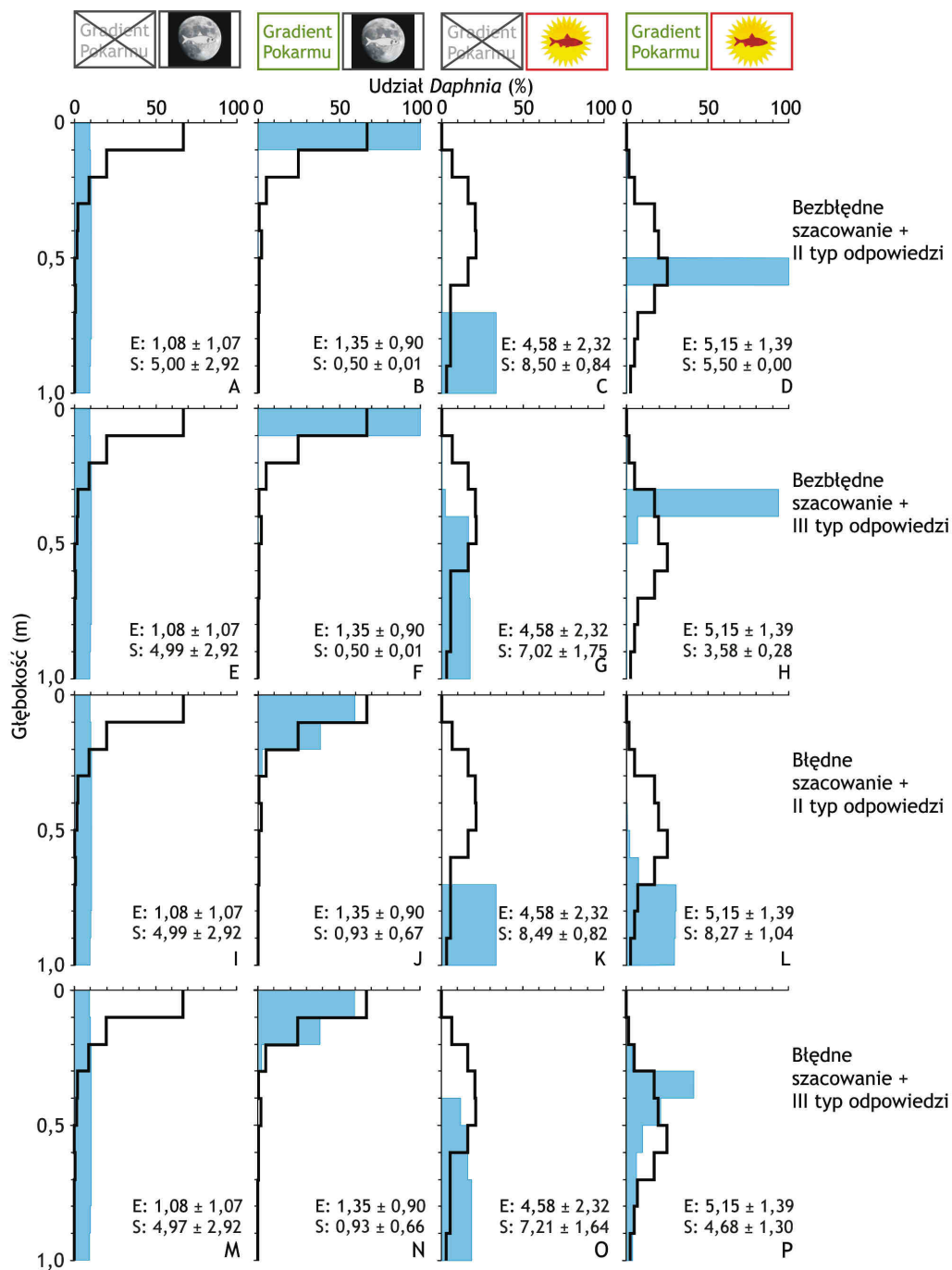
**Rys. 25.** Rozmieszczenie młodych (2,5 dniowych) *Daphnia* w niskim zagęszczeniu ich populacji (% w każdym sektorze; każdy rozkład uśredniony dla eksperymentów przeprowadzonych dla zagęszczeń między 3,9 i 6,9 osobn.  $\times L^{-1}$ ) w jednym z czterech wariantów: (1) w nieobecności gradientu pokarmu glonowego i w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (A, E, I, M), (2) w obecności jedynie gradientu pokarmu (B, F, J, N), (3) w obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie (C, G, K, O), i (4) w nakładających się na siebie obydwu gradientach (D, H, L, P), w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i*

metody, II.2.5.3, puste pola) na tle rozkładów z eksperymentów wirtualnych powstałych wskutek symulacji w tych samych zagęszczeniach populacji (*Materiał i metody, II.2.6, niebieskie pola*) dla każdego z 4 scenariuszy założeń modelu optymalizacyjnego: (1) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi funkcjonalnej Hollinga (A, B, C, D), (2) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (E, F, G, H), (3) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu (a tym samym tempa wzrostu), jak również, natężenia światła (a tym samym ryzyka śmierci), a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi (I, J, K, L) i (4) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu, jak również, natężenia światła, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (M, N, O, P). Dla każdej z 16 par rozkładów, osobno dla rozkładu z eksperymentu rzeczywistego (E) i z symulacji (S), podana została średnia głębokość, na której przebywały osobniki  $\pm$  odchylenie standardowe.



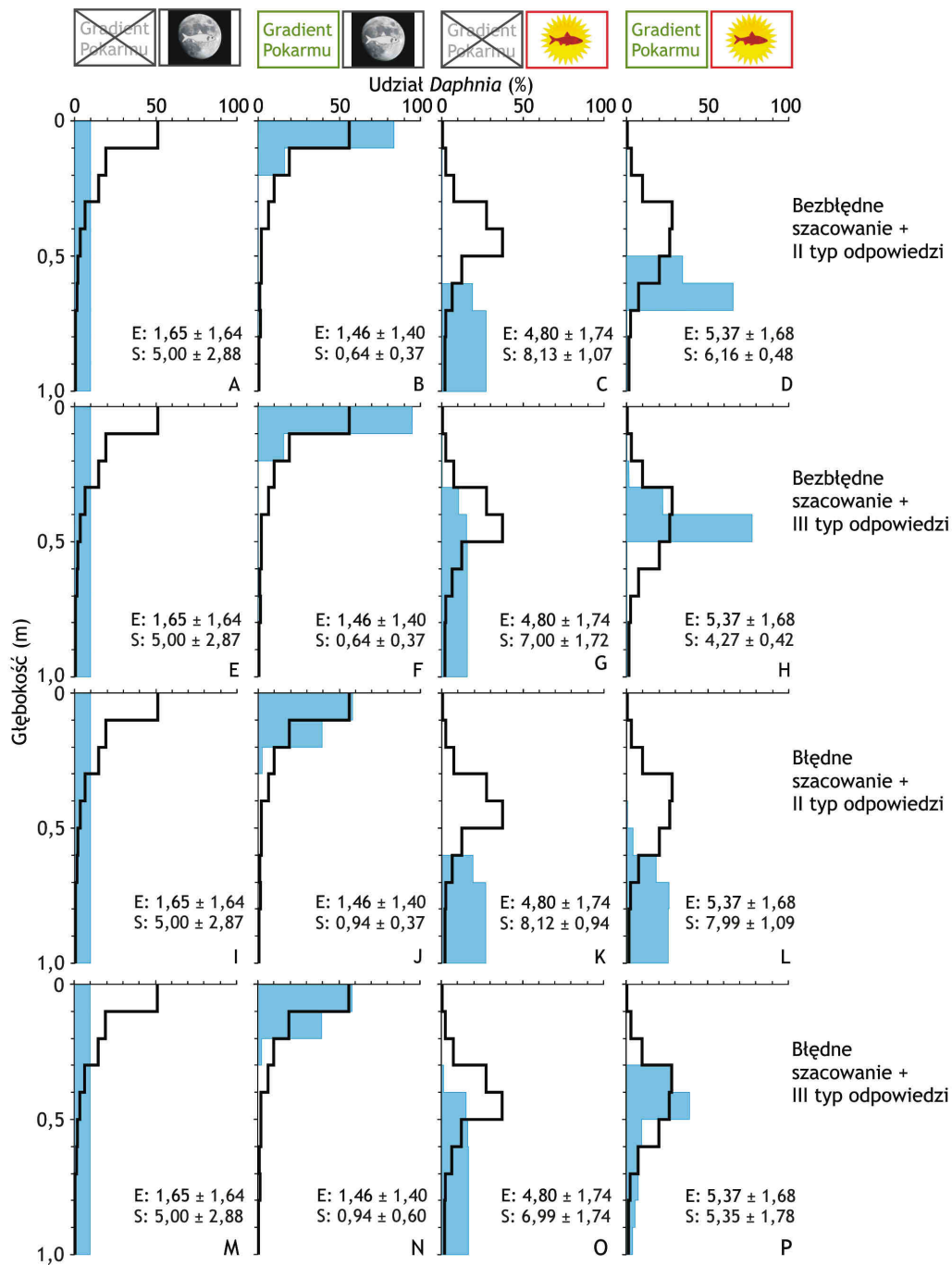
**Rys. 26.** Rozmieszczenie młodych (2,5 dniowych) *Daphnia* w wysokim zagęszczeniu ich populacji (% w każdym sektorze; każdy rozkład uśredniony dla eksperymentów przeprowadzonych dla zagęszczeń między 39,1 i 59,4 osobn.  $\times L^{-1}$ ) w jednym z czterech wariantów: (1) w nieobecności gradientu pokarmu glonowego i w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (A, E, I, M), (2) w obecności jedynie gradientu pokarmu (B, F, J, N), (3) w obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie (C, G, K, O), i (4) w nakładających się na siebie obydwu gradientach (D, H, L, P), w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, puste pola) na tle rozkładów z eksperymentów wirtualnych powstałych

wskutek symulacji w tych samych zagęszczeniach populacji (*Materiał i metody*, II.2.6, niebieskie pola) dla jednego z trzech (wybranych z 8) scenariuszy założeń modelu optymalizacyjnego: (1) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi funkcjonalnej Hollinga (A, B, C, D), (2) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (E, F, G, H), (3) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu (a tym samym tempa wzrostu), jak również, natężenia światła (a tym samym ryzyka śmierci), a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi (I, J, K, L) i (4) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu, jak również, natężenia światła, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (M, N, O, P). Dla każdej z 16 par rozkładów, osobno dla rozkładu z eksperymentu rzeczywistego (E) i z symulacji (S), podana została średnia głębokość, na której przebywały osobniki  $\pm$  odchylenie standardowe.



**Rys. 27.** Rozmieszczenie dojrzałych (5,5 dniowych) *Daphnia* w niskim zagęszczeniu ich populacji (% w każdym sektorze; każdy rozkład uśredniony dla eksperymentów przeprowadzonych dla zagęszczeń między 3,0 i 9,9 osobn.  $\times L^{-1}$ ) w jednym z czterech wariantów: (1) w nieobecności gradientu pokarmu glonowego i w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (A, E, I, M), (2) w obecności jedynie gradientu pokarmu (B, F, J, N), (3) w obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie (C, G, K, O), i (4) w nakładających się na siebie obydwu gradientach (D, H, L, P), w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, puste pola) na tle rozkładów z symulacji powstałych w tych samych

zagęszczeniach populacji (*Materiał i metody*, II.2.6, niebieskie pola) dla jednego z trzech (wybranych z 8) scenariuszy założeń modelu optymalizacyjnego: (1) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi funkcjonalnej Hollinga (A, B, C, D), (2) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (E, F, G, H), (3) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu (a tym samym tempa wzrostu), jak również, natężenia światła (a tym samym ryzyka śmierci), a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi (I, J, K, L) i (4) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu, jak również, natężenia światła, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (M, N, O, P). Dla każdej z 16 par rozkładów, osobno dla rozkładu z eksperymentu rzeczywistego (E) i z symulacji (S), podana została średnia głębokość, na której przebywały osobniki  $\pm$  odchylenie standardowe.



**Rys. 28.** Rozkład wyboru głębokości przez dojrzałe (5,5 dniowe) *Daphnia* w wysokim zagęszczeniu ich populacji (% w każdym sektorze; każdy rozkład uśredniony dla eksperymentów przeprowadzonych dla zagęszczeń między 35,7 i 60,1 osobn.  $\times L^{-1}$ ) w jednym z czterech wariantów: (1) w nieobecności gradientu pokarmu glonowego i w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (A, E, I, M), (2) w obecności jedynie gradientu pokarmu (B, F, J, N), (3) w obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie (C, G, K, O), i (4) w nakładających się na siebie obydwu



gradientach (D, H, L, P), w eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych (*Materiał i metody*, II.2.5.3, puste pola) na tle rozkładów z eksperymentów wirtualnych powstałych wskutek symulacji w tych samych zagęszczeniach populacji (*Materiał i metody*, II.2.6, niebieskie pola) dla jednego z trzech (wybranych z 8) scenariuszy założeń modelu optymalizacyjnego: (1) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi funkcjonalnej Hollinga (A, B, C, D), (2) *Daphnia* mają kompletną wiedzę o jakości na każdej głębokości, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (E, F, G, H), (3) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu (a tym samym tempa wzrostu), jak również, natężenia światła (a tym samym ryzyka śmierci), a żerowanie ryby jest zgodne z II typem odpowiedzi (I, J, K, L) i (4) *Daphnia* popełniają błąd zarówno przy szacowaniu stężenia pokarmu, jak również, natężenia światła, a żerowanie ryby jest zgodne z III typem odpowiedzi (M, N, O, P). Dla każdej z 16 par rozkładów, osobno dla rozkładu z eksperymentu rzeczywistego (E) i z symulacji (S), podana została średnia głębokość, na której przebywały osobniki  $\pm$  odchylenie standardowe.

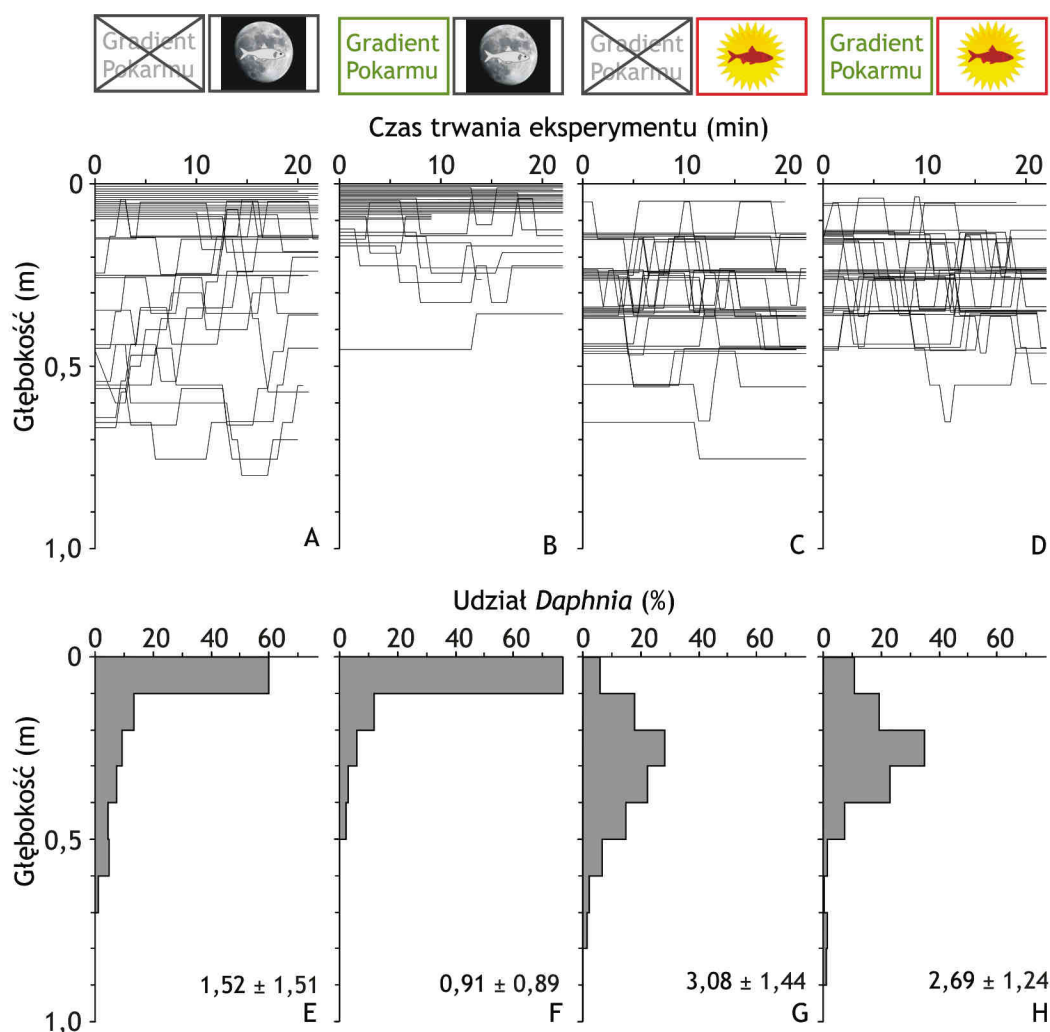
### III.2.3. Wybór głębokości przez pojedyncze *Daphnia*

Uśredniona (dla wszystkich osobników w danym wariancie) głębokość *Daphnia* w „eksperymentach dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki” (*Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a-c) zależała istotnie od wariantu eksperymentalnego, w którym przebywały (w nieobecności któregośkolwiek gradientu, jedynie w gradiencie pokarmu, jedynie w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie lub w obydwu gradientach,  $P < 0,0001$ ,  $F = 72,64_{3;252}$ ), jak również od ich wieku (młode lub dojrzałe,  $P < 0,0001$ ,  $F = 40,90_{1;252}$ ), ale nie od kolumny (L lub P), w której przeprowadzony został eksperyment ( $P = 0,3879$ ,  $F = 0,75_{1;252}$ , trzyczynnikowa ANOVA, Rys. 29 i 30). Szczegółowa analiza wykazała, że głębokość, na której przebywały osobniki, nie różniła się istotnie między wariantami w obecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie i w obecności obydwu gradientów, ale była istotnie różna między wariantem w nieobecności któregośkolwiek gradientu i w gradiencie pokarmu, jak również między wariantem z gradientem pokarmu i wariantem z obydwoma gradientami (trzyczynnikowa ANOVA, test *post-hoc*, Rys. 29 i 30). Osobniki dojrzałe przebywały głębiej w wariancie z gradientem informacji o niebezpieczeństwie oraz w wariancie z obydwoma gradientami, natomiast różnica w głębokości wybieranej przez osobniki młode i dojrzałe nie była istotna w pozostałych dwóch wariantach (trzyczynnikowa ANOVA, test *post-hoc*, Rys. 29 i 30)

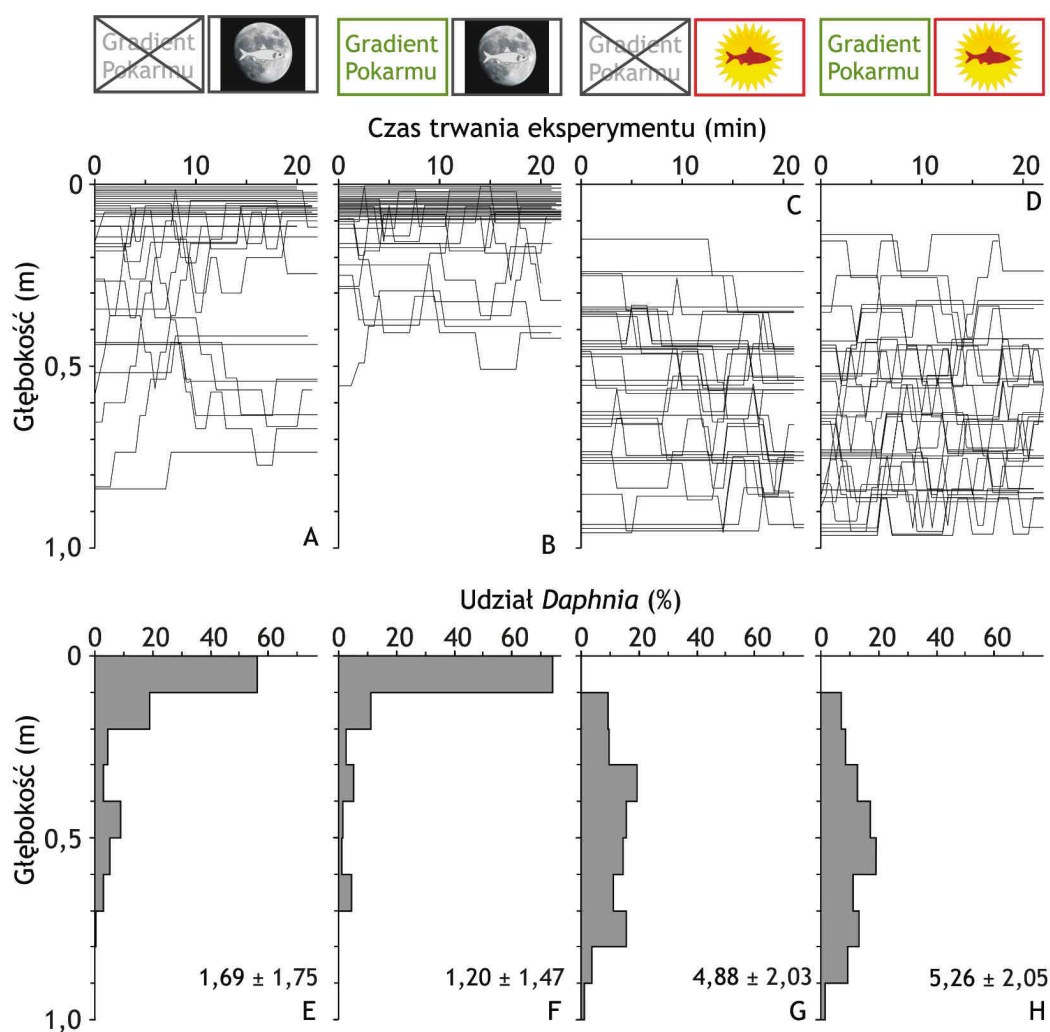
Zarówno ruchliwość (uśredniona dla wszystkich osobników suma zmian głębokości pojedynczego osobnika), zróżnicowanie wyboru głębokości (uśrednione dla wszystkich osobników odchylenie standardowe od średniej głębokości wybieranej przez pojedynczego osobnika – z dokładnością do jednego sektora), zróżnicowanie ruchliwości (odchylenie standardowe od ruchliwości pojedynczych osobników) jak również zróżnicowanie zróżnicowania wyboru głębokości (odchylenie standardowe od odchyleń standardowych od średniej głębokości wybieranej przez każdego osobnika) w trakcie 20 minut w każdym z czterech wariantów eksperymentalnych w „eksperymentach dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki” (*Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a-c) było większe u osobników dojrzałych, niż młodych (Rys. 29 i 30, Tabela 19). Ruchliwość była najmniejsza w samym gradiencie pokarmu i największa w obydwu gradientach, co było szczególnie wyraźne u osobników dojrzałych. Zróżnicowanie wyboru głębokości również było wyraźnie najmniejsze w gradiencie pokarmu dla obydwu klas wiekowych, i również największe w obydwu gradientach, ale jedynie dla osobników dorosłych. Co więcej, różnica w zróżnicowaniu wyboru głębokości między wariantem z obydwoma gradientami i pozostałymi

wariantami była znacznie mniejsza, niż przy porównaniu ruchliwości. Zróżnicowanie ruchliwości było najmniejsze w gradiencie pokarmu i największe w nieobecności któregośkolwiek gradientu. Zróżnicowanie zróżnicowania wyboru głębokości było najmniejsze w obydwu gradientach i w gradiencie pokarmu, natomiast największe w nieobecności któregośkolwiek gradientu (Tabela 19).

Uśredniona głębokość wybierana przez *Daphnia* przebywające pojedynczo w „eksperymentach dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki” (Materiał i metody, II.2.5.4, Tabela 9a-c) była istotnie różna od średniej głębokości *Daphnia* przebywających w wysokim zagęszczeniu ich populacji „w eksperymentach dla wyznaczenia pionowego rozmieszczenia *Daphnia* w różnym zagęszczeniu ich populacji, Materiał i metody, 2.5.3”, gdy dane ze wszystkich czterech wariantów były rozpatrywane łącznie ( $P < 0,0259$ ,  $F = 5,01_{1;282}$ , czteroczynnikowa ANOVA). Efekt zagęszczenia nie zależał istotnie od kolumny, w której przeprowadzony został eksperyment, ani od wieku *Daphnia*, ani od wariantu eksperymentalnego (czteroczynnikowa ANOVA). Szczegółowa analiza nie wykazała istotnych różnic w efekcie zagęszczenia, gdy porównywana była średnia głębokość w każdym z czterech wariantów z osobna (czteroczynnikowa ANOVA, test *post-hoc*, Rys. 29 i 30).



**Rys. 29.** Wybór głębokości przez 2,5-dniowe (młode) *Daphnia* w jednym z czterech wariantów eksperymentalnych (w nieobecności gradientu pokarmu, ani gradientu informacji o niebezpieczeństwie A, E; w obecności jedynie gradientu pokarmu B, F; w obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie C, G; i w obecności obydwu tych gradientów D, H) we właściwych eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych przeprowadzonych dla pojedynczych osobników (*Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a-c), przebywających w jednej z kolumn (L lub P) właściwej (trzeciej) wersji układu eksperymentalnego dla badania rozmieszczenia zooplanktonu (*Materiał i metody*, II.2.3.4), pokazany jako: (1) zmiany głębokości między sektorami układu w co półminutowych odstępach podczas 22 minutowej obserwacji (A, B, C i D, aby zminimalizować efekt nachodzenia się linii na siebie, każda grupa linii rozpoczynająca się od środka danego sektora została symetrycznie przesunięta względem środka tego sektora) oraz jako (2) rozkład frekwencji osobników między 10 sektorami układu (% frekwencja w każdym sektorze względem wszystkich cominutowych obserwacji dla wszystkich osobników, szare pole). Dla każdego z 4 rozkładów, podana została średnia głębokość, na której przebywały osobniki  $\pm$  odchylenie standardowe.



**Rys. 30.** Wybór głębokości przez 5,5-dniowe (dojrzałe) *Daphnia* w jednym z czterech wariantów eksperymentalnych (w nieobecności gradientu pokarmu, ani gradientu informacji o niebezpieczeństwie A, E; w obecności jedynie gradientu pokarmu B, F; w obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie C, G; i w obecności obydwu tych gradientów D, H) we właściwych eksperymentach rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych przeprowadzonych dla pojedynczych osobników (*Materiał i metody*, II.2.5.4, Tabela 9a-c), przebywających w jednej z kolumn (L lub P) właściwej (trzeciej) wersji układu eksperymentalnego dla badania rozmieszczenia zooplanktonu (*Materiał i metody*, II.2.3.4), pokazany jako: (1) zmiany głębokości między sektorami układu w co półminutowych odstępach podczas 22 minutowej obserwacji (A, B, C i D, aby zminimalizować efekt nachodzenia się linii na siebie, każda grupa linii rozpoczynająca się od środka danego sektora została symetrycznie przesunięta względem środka tego sektora) oraz jako (2) rozkład frekwencji osobników między 10 sektorami układu (% frekwencja w każdym sektorze względem wszystkich cominutowych obserwacji dla wszystkich osobników, szare pole). Dla każdego z 4 rozkładów, podana została średnia głębokość, na której przebywały osobniki  $\pm$  odchylenie standardowe.

**Tabela 19.** Ruchliwość (średnia wartość bezwzględna zmian głębokości w trakcie 22 minut) oraz zróżnicowanie wybieranej głębokości (jako odchylenie standardowe od średniej głębokości) pojedynczego osobnika (młodego lub dorosłego) uśredniona ( $\pm$  SD) dla wszystkich osobników w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych przeprowadzonych dla zbadania wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki (*Materiał i metody, II.2.5.4, Tabela 9a-c*), w których każdy osobnik przebywał w jednym z czterech wariantów: w nieobecności któregośkolwiek gradientu, w gradiencie pokarmu, w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy i w obydwu nakładających się na siebie gradientach

Wariant	Ruchliwość				Zróżnicowanie wyboru głębokości			
	Średnia		SD		Średnia		SD	
	Młode	Dojrzałe	Młode	Dojrzałe	Młode	Dojrzałe	Młode	Dojrzałe
Brak	2,81	2,94	3,01	3,54	0,57	0,53	0,63	0,62
Gradient pokarmu	0,69	1,42	1,12	1,98	0,17	0,26	0,24	0,35
Gradient informacji o drapieżcy	2,55	2,94	1,99	2,14	0,46	0,61	0,33	0,37
Obydwa gradienty	3,04	5,92	2,06	3,32	0,49	0,68	0,27	0,27

## IV. Dyskusja

### IV.1. Wprowadzenie

Wyniki otrzymane w ramach realizacji projektu rozprawy pozwoliły na weryfikację hipotezy „rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji”. Sądzę, że jest to pierwsza metodycznie prawidłowo przeprowadzona weryfikacja tej hipotezy dla zwierząt planktonowych z wykorzystaniem porównania pomiędzy sobą wyników rozmieszczenia otrzymanych w symulacjach wygenerowanych na podstawie założeń ilościowego modelu optymalizacyjnego z wynikami eksperymentu przeprowadzonego w jedynym znanym mi nadającym się do tego celu układzie eksperymentalnym. Choć głównym celem rozprawy była weryfikacja tej hipotezy, to eksperymenty przeprowadzone w ramach realizacji projektu rozprawy zostały zaplanowane tak, aby wyniki w nich otrzymane pozwoliły również na weryfikację kilku innych hipotez dodatkowych. Ponieważ większość z tych hipotez została opisana i przedyskutowana w jednej z 6 publikacji załączonych do rozprawy jako załączniki

4-9, w dyskusji ograniczyłem się przede wszystkim do opisu wiarygodności wyników niezbędnych dla weryfikacji hipotezy głównej.

#### **IV.2. Eksperymenty dla parametryzacji modelu oraz symulacje**

Ze względu na to, że w wariancie w nieobecności któregośkolwiek gradientu jedynym czynnikiem wpływającym na tempo wzrostu w modelu i tym samym na wybór głębokości przez *Daphnia* było zagęszczenie populacji, to osobniki wirtualne rozmieszczały się tak, aby minimalizować oddziaływania interferencyjne z innymi osobnikami i ich rozmieszczenie w symulacjach, zarówno w niskim, jak i w wysokim zagęszczeniu, było równomierne.

W samym gradiencie pokarmu (z maksimum jego obfitości w warstwach przypowierzchniowych), w scenariuszu, w którym wirtualne osobniki spełniały każde z trzech założeń modelu interferencyjnego rozmieszczenia idealnie swobodnego tj. były identyczne (w tym samym wieku), miały pełną swobodę w przemieszczaniu się w orientacji pionowej i bezbłędnie szacowały stężenie pokarmu glonowego na każdej głębokości (podobnie jak w modelach Sutherland'a (1983), Tregenzy (1995b) oraz Tregenzy i in. (1996), wszystkie osobniki (szczególnie w niskim zagęszczeniu populacji) gromadziły się w górnym lub w dwóch górnych sektorach, ponieważ oddziaływania interferencyjne między osobnikami, wyznaczone w eksperymentach dla parametryzacji modelu, były bardzo słabe, nawet w wysokim zagęszczeniu populacji, i osobniki podejmowały decyzję o wyborze głębokości przede wszystkim na podstawie zmian obfitości pokarmu w danym sektorze. W scenariuszu, w którym założenie „bezbłędności” wirtualnych *Daphnia* zostało zastąpione założeniem, że osobniki popełniają błędy w szacowaniu stężenia pokarmu, które wynika z niedoskonałej pamięci lub/i z niedoskonałej wiedzy o stężeniu pokarmu na innych głębokościach, ich rozmieszczenie stało się bardziej równomierne, szczególnie u młodych osobników, ze względu na to, że został dla nich wyznaczony większy błąd w szacowaniu zasobów na podstawie wyników z eksperymentów dla parametryzacji modelu. Większość wyników otrzymanych w eksperymentach dla wyznaczenia zależności tempa wzrostu od klasy wiekowej i warunków środowiska oraz dla wyznaczenia potencjalnego błędu w szacowaniu stężenia pokarmu przez *Daphnia* była raczej przewidywalna, może z jednym wyjątkiem, takim mianowicie, że dla *Daphnia* poszukujących miejsca w heterogennie rozmieszczonym pokarmie, większe było zróżnicowanie w tempie wzrostu, niż w pokarmie rozmieszczonym homogennie, co sugeruje, że pionowe gradienty pokarmu mogą być dla zwierząt planktonowych czynnikiem selekcyjnym.

Gradient informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy został wprowadzony do modelu *IFD* jako gradient kosztów (w postaci prawdopodobieństwa śmierci ze strony drapieżnika), które musiałby ponieść osobnik wybierając daną głębokość, przy założeniu, że każdy osobnik jest w stanie (albo z błędem, albo bezbłędnie) oszacować jakość środowiska na każdej głębokości i tym samym swoje potencjalne dostosowanie, uwzględniając zarówno potencjalne tempo wzrostu, jak również potencjalne ryzyko śmierci ze strony drapieżcy (Moody i in. 1996). Ze względu na prosty cykl życiowy, łatwość w hodowli oraz dobrze poznaną ekologię *Daphnia*, relatywnie łatwo było eksperymentalnie sparametryzować zarówno zależne od zagęszczenia populacji i wielkości ciała tempo jej wzrostu, jak też ryzyko śmierci. Gradient kosztów po raz pierwszy do modelu *IFD* został wprowadzony przez Tylera i Gilliama (1995) dla prognozowania wpływu prędkości przepływu wody, jako czynnika zwiększającego koszty energetyczne związane z pozyskiwaniem pokarmu, na rozmieszczenie idealnie swobodne ryb (*Rhinichthys atratulus*). O ile zastosowany przez nich model prognozuje wpływ gradientu kosztów na rozmieszczenie zwierząt w gradiencie ciągłej dostawy zasobów (ang. *continuous input*), o tyle model wykorzystany dla weryfikacji hipotezy rozprawy prognozuje wpływ gradientu kosztów na rozmieszczenie zwierząt w stabilnym gradiencie stężenia pokarmu (zgodnie ze scenariuszem modeli interferencyjnych). Drugą ważną różnicą między modelem Tylera i Gilliama i modelem zastosowanym dla weryfikacji hipotezy rozprawy jest to, że tylko model zastosowany dla weryfikacji hipotezy rozprawy uwzględnia wpływ takiej cechy środowiska (tj. ryzyka śmierci), która zależy od zagęszczenia populacji.

Literatura przedmiotu dostarcza dotychczas tylko jednego przykładu pracy modelowej, w którym wykorzystano model *IFD* dla prognozowania zależnego od zagęszczenia rozmieszczenia zooplanktonu, na przykładzie *Copepoda*, w gradiencie ryzyka śmierci ze strony ryb planktonożernych (Giske i in. 1997). Tak, jak w modelu opisanym w rozprawie, (również w modelu Giske i in. 1997) każdy osobnik wybierał taką głębokość, która gwarantowała mu najwyższe dostosowanie mierzone ilorazem tempa wzrostu do ryzyka śmierci (Werner i Gilliam 1984). Z tym, że Giske i współautorzy (1997) poszukiwali rozmieszczenia idealnie swobodnego nie poprzez zastosowanie modelowania osobniczego, a za pomocą tzw. podejścia analitycznego, czyli „ręcznego” przeliczania dostosowania osobnika. W takim przypadku można znaleźć optymalne rozmieszczenie osobnika wiedząc, że w stanie równowagi dostosowanie we wszystkich zajętych przez zwierzęta sektorach powinno być takie samo. Ze względu na to, że przy takim rozwiązaniu szuka się najlepszego rozmieszczenia dla każdej kombinacji zajętych/niezajętych fragmentów środowiska z



bogatym pokarmem (ang. *patches*), to gdy w układzie wykorzystanym w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych było 10 sektorów, dawałoby to aż 1024 kombinacji dotyczących obecności lub braku *Daphnia* w każdym z sektorów (typu: 1 – zajęte, 2 – zajęte, ... 5 – zajęte, 6 – wolne, 7 – wolne, ..., 10 – wolne). Pomimo tego, że to „matematyczne” podejście wydaje się często bardziej intuicyjne dla poszukiwania rozmieszczeń optymalnych, niż modele osobnicze, które są rodzajem „czarnej skrzynki”, do których wprowadza się dane i dostaje się wynik nie wiedząc, jakie dokładnie procesy zachodzą dla osiągnięcia finalnego rozmieszczenia, to model wykorzystany dla weryfikacji hipotezy rozprawy jest na tyle prosty, że trudno jest stosować ten argument. Natomiast zaletą modeli osobniczych, w porównaniu do modeli „analitycznych” jest to, że znacznie łatwiej jest osłabiać założenia i dodawać bardziej realistyczne elementy, takie jak np. błąd w szacowaniu warunków środowiska przez zwierzęta. Można się spodziewać, że przy weryfikacji hipotezy rozprawy, obydwa podejścia (indywidualne i analityczne) powinny dać bardzo podobne wyniki. Ważną różnicą między modelem opisanym w pracy Giske i współautorów (1997) oraz w modelu wykorzystanym dla weryfikacji rozprawy jest również to, że ten pierwszy był, z jednej strony, bardziej złożony, ponieważ uwzględniał nie tylko rozmieszczenie zooplanktonu w gradientach pokarmu i ryzyka śmierci ze strony ryb planktonożernych, ale również w gradientach temperatury i ryzyka śmierci ze strony drapieżników bezkręgowych, i z drugiej strony, był prostszy, ponieważ uwzględniał jedynie II typ odpowiedzi funkcjonalnej Hollinga dla prognozowania zależnego od zagęszczenia ryzyka śmierci ze strony ryb planktonożernych.

Jednym z ciekawszych wyników otrzymanych w eksperymentach dla parametryzacji modelu było wyznaczenie kształtu odpowiedzi funkcjonalnej ryby planktonożernej żerującej na zooplanktonie, który, w przeciwieństwie do wyników otrzymanych we wcześniejszych badaniach przeprowadzonych przez innych autorów w zminiaturyzowanych układach eksperymentalnych (Tabela 1), okazał się być zgodny z III, a nie z II typem odpowiedzi funkcjonalnej (Rys. 17). Pomimo otrzymania takiego wyniku, symulacje zostały wygenerowane również dla scenariusza założeń uwzględniającego II typ, ponieważ początkowe założenie przyjęte dla weryfikacji hipotezy było alternatywą zakładającą, że kształt odpowiedzi jest właśnie zgodny z II lub z III typem. W gradiencie samej informacji o niebezpieczeństwie, osobniki wirtualne przy II typie przebywały głębiej w słupie wody. Co więcej, o ile przy II typie odpowiedzi *Daphnia* przebywały głębiej przy niskim zagęszczeniu populacji, o tyle przy III typie przebywały głębiej w zagęszczeniach wysokich. Ze względu na to, że w eksperymentach dla wyznaczenia zależności odległości reakcji ryby planktonożernej od natężenia i składu spektralnego światła, różnice w odległości reakcji względem młodej i

dojrzałej *Daphnia* były relatywnie niewielkie. Również różnice w średniej głębokości wirtualnych osobników w symulacjach (w samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie) były niewielkie, przynajmniej przy założeniu II typu odpowiedzi. Przy III typie odpowiedzi różnica się nieznacznie powiększała ze względu na przyjęcie większej wartości parametru  $\gamma$  dla osobników młodych, niż dojrzałych, odpowiadającemu progowej wartości zagęszczenia populacji ofiary, przy którym ryba zaczyna intensywnie żerować na danej klasie wiekowej/wielkości. Ze względu na to, że znana z literatury (Ringelberg i in. 1967) progowa różnica w natężeniu światła, którą już dostrzegają *Daphnia* i na nią reagują, okazała się bardzo mała, to również znikomy okazał się wpływ błędu w szacowaniu natężenia światła i tym samym ryzyka śmierci na wybór głębokości podejmowany przez wirtualne *Daphnia* w wariancie z jedynie gradientem informacji o niebezpieczeństwie.

Tak, jak w przypadku symulacji wygenerowanych na podstawie założeń modelu Giskego i współautorów (1997), w obydwu nakładających się gradientach pokarmu i informacji o niebezpieczeństwie, również i w symulacjach wygenerowanych na podstawie trzech z czterech scenariuszy założeń modelowych (z wyjątkiem scenariusza z *Daphnia* popełniającą błędy i przy założeniu II typu odpowiedzi), większość wirtualnych osobników gromadziła się w sektorach pośrednich wirtualnej kolumny eksperymentalnej (Rys. 25-28). Podobnie (i z tych samych powodów), jak w symulacjach w samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie, również w obydwu nakładających się na siebie gradientach, osobniki dojrzałe przebywały głębiej, niż osobniki młodsze, i o ile przy II typie odpowiedzi przebywały głębiej w niższych zagęszczeniach populacji, o tyle przy III typie przebywały głębiej w zagęszczeniach wyższych (Rys. 23 i 24). Założenie „błędnej *Daphnia*” wpływało wyraźnie na rozmieszczenie, co wynikało z większego błędu w szacowaniu stężenia pokarmu, niż w szacowaniu natężenia światła wyznaczonego w eksperymentach dla parametryzacji modelu (Rys. 25-28). Mniejszy błąd *Daphnia* w szacowaniu ryzyka śmierci, niż w szacowaniu stężenia pokarmu, wydaje się uzasadniony ewolucyjnie ze względu na niewspółmiernie większą istotności zjawiska śmierci, niż zjawiska głodowania (Milinski i Heller 1978, Lima i in. 1985, Gliwicz 1999).

### **IV.3. Porównanie wyników symulacji z wynikami z eksperymentów rzeczywistych dla weryfikacji prognoz modelowych**

#### **IV.3.1. Porównanie prognoz modelowych i wyników z eksperymentów rzeczywistych w nieobecności któregoś z gradientów**

W nieobecności któregośkolwiek gradientu hipoteza nie została potwierdzona, ponieważ rozmieszczenie zarówno osobników młodych, jak i dojrzałych, w eksperymentach rzeczywistych, różniło się bardzo wyraźnie od rozmieszczenia wirtualnego w symulacjach (Rys. 23 i 24 oraz 25-28). Pomimo tego, że rozkłady te różniły się wyraźnie, należy zwrócić uwagę na to, że mogło to być wynikiem jedynie bardzo słabego kierunkowego oddziaływania jakiegoś dodatkowego czynnika oddziałującego na *Daphnia* jedynie w eksperymentach rzeczywistych. Można się tego spodziewać, ponieważ równomierność rozmieszczenia osobników wirtualnych, była uwarunkowana jedynie bardzo słabymi oddziaływaniami interferencyjnymi między osobnikami. Takiego efektu można było się spodziewać w wyniku kierunkowego przepływu medium w kolumnach eksperymentalnych od dołu ku górze. Jednak wyniki eksperymentów wstępnych wykazały, że przepływ medium w kolumnach był na tyle powolny, że nie wpływał istotnie na rozmieszczenie *Daphnia* (zarówno w obecności, jak i w nieobecności tego przepływu osobniki wybierały warstwy przypowierzchniowe, Rys. 19). Prawdopodobnym czynnikiem odpowiedzialnym za płynięcie *Daphnia* w kierunku warstw przypowierzchniowych była „pamięć ewolucyjna” tj. dodatkowa motywacja *Daphnia* do płynięcia w kierunku warstw przypowierzchniowych, które są na ogół najbardziej zasobne w pokarm, szczególnie wtedy, gdy na głębokości, na której znajduje się osobnik, jest niski poziom pokarmu.

#### **IV.3.2. Porównanie prognoz modelowych i wyników z eksperymentów rzeczywistych w gradiencie pokarmu**

W samym gradiencie pokarmu, hipoteza została natomiast potwierdzona, choć pozostają tu wątpliwości dotyczące interpretacji wyników. Dla osobników młodych, najlepsze dopasowanie, zarówno w wysokim, jak i w niskim zagęszczeniu ich populacji, stwierdzono dla scenariusza nie uwzględniającego błędu w szacowaniu obfitości pokarmu (Rys. 23 i Tabela 17). Rozkłady obrazujące rozmieszczenie wirtualnych *Daphnia* w tym scenariuszu były jednak nieco bardziej skoncentrowane, szczególnie w niskim zagęszczeniu populacji, w którym wszystkie osobniki w symulacjach wybrały sektor najbliższej powierzchni, choć w eksperymentach rzeczywistych niemal połowa osobników wybrała sektor drugi od góry lub nawet niższe sektory (Rys. 25). Również nie wszystkie osobniki wybrały sektor górny w eksperymentach z pojedynczym osobnikiem (Rys. 29). Sugeruje to, że jednak młode osobniki, w stanie ostatecznie ukształtowanej równowagi w ich rozmieszczeniu, nie przez cały czas przebywały na głębokości, która gwarantowała najwyższe tempo wzrostu. Z drugiej strony, rozmieszczenie osobników wirtualnych w scenariuszu z uwzględnieniem błędu było wyraźnie

bardziej równomierne, niż rozmieszczenie osobników w eksperymencie rzeczywistym. Łącząc te fakty, wydaje się, że jednak osobniki młode nie zawsze odnajdywały głębokość gwarantującą im najwyższe tempo wzrostu, ale błąd wyznaczony w eksperymentach dla parametryzacji modelu z jakichś niezidentyfikowanych powodów został przeszacowany lub przeszacowane zostały konsekwencje tego błędu dla wyboru głębokości. Dla osobników dojrzałych, zarówno w niskim (Rys. 25 i 27), jak i w wysokim (Rys. 25 i 28) zagęszczeniu ich populacji, lepsze dopasowanie rozmieszczenia rzeczywistego do rozmieszczenia w symulacjach było dla scenariusza uwzględniającego błędy przy szacowaniu stężenia pokarmu glonowego. Można przypuszczać, że błąd w odnajdywaniu najlepszego miejsca zarówno przez osobniki młode, jak i dojrzałe, mógłby być większy, gdyby najwyższe stężenie pokarmu było w innym sektorze, niż ten najbliższej powierzchni, ponieważ gromadzenie się osobników w sektorze przy powierzchni wynikać może nie tylko z wybierania takiej głębokości ze względu na obfitszy pokarm, ale również ze względu na to, że *Daphnia* wykazują tendencję do pływnięcia w kierunku warstw przypowierzchniowych. Odnosząc otrzymane wyniki do warunków naturalnych w jeziorze, konsekwencje błędu *Daphnia* mogą być z jednej strony, nawet większe, ze względu na to, że w eksperymentach rozmieszczały się w układzie zminiaturyzowanym, w którym szybciej mogły swój błąd skorygować, ale z drugiej strony, mogą być jednak mniejsze ze względu na to, że stężenie pokarmu (a także jego jakość) nie są w pełni przewidywalne w warunkach naturalnych, tj. nie zawsze najwyższe stężenie pokarmu jest w warstwach przypowierzchniowych (np. Williamson i in. 1996, Lampert i in. 2003).

Literatura przedmiotu dostarcza licznych przykładów, dla różnych grup zwierząt kręgowych i bezkręgowych, w których podjęto próbę przetestowania założeń koncepcji rozmieszczenia idealnie swobodnego (*IFD*) w gradiencie zasobów, zarówno na podstawie rozmieszczenia zwierząt w warunkach naturalnych, jak również na podstawie ich rozmieszczenia w ściśle kontrolowanych warunkach laboratoryjnych, ich przegląd znaleźć można u Tregenzy (1995a) i u Maszczyka (2008). Olbrzymia większość testów na podstawie opisanych tam obserwacji lub eksperymentów terenowych przeprowadzona została w sytuacji, gdy zwierzęta rozmieszczały się w gradiencie zasobów, więc prognoza modelu zerowego powinna była być zgodna ze scenariuszem modeli interferencyjnych *IFD* (*IIFD*), co oznacza, że przy niskim zagęszczeniu populacji wszystkie osobniki powinny wybierać miejsce najbardziej zasobne, a w wyższych zagęszczeniach, wobec konkurencji o miejsce, rozmieszczenie powinno być bardziej równomierne. Jednak w wielu z tych prac (np. Power 1984, przegląd innych przykładów takich prac u Tregenzy 1995b i u Milinskiego 1994b) przyjęta została błędna prognoza dla rozmieszczenia, wynikająca z założeń modelu zerowego

dla scenariusza ciągłej dostawy zasobów (ang. *continuous input*) tj. że rozmieszczenie konkurentów powinno być wprost-proporcjonalne do gradientu dostawy zasobów. Jest to powszechnie popełniany błąd, który również i ja popełniłem w swojej pracy przeglądowej dotyczącej koncepcji *IFD* (Maszczyk 2008, Załącznik 1). Wobec tego, jakiegokolwiek wnioskowanie w tych pracach o przyczynach odstępstw od rozmieszczania zgodnego z prognozami modelu zerowego jest obarczone błędem i w zasadzie z prac tych wynika tylko to, że rozmieszczenie zwierząt jest bardziej równomierne, niż wynikałoby to z prognoz prawidłowego modelu zerowego (modelu *IIFD*). W przypadku badań, w których przyjęte zostały prawidłowe założenia i prognozy zgodne ze scenariuszem modeli interferencyjnych, na ogół wykazywano, że rozmieszczenie jest bardziej równomierne, niż wynikałoby to jedynie z rozmieszczenia zasobów i interferencji między osobnikami i poszukiwano przyczyn odstępstwa od rozmieszczenia zgodnego z prognozami modelu zerowego poprzez testowanie wpływu różnych czynników, na przykład: różnic indywidualnych, wpływu zachowań despotycznych (terytorializmu), kosztów przemieszczania się z miejsca do miejsca, niekompletnej wiedzy o zasobności każdego miejsca, i obecności nadmiaru pokarmu w środowisku (Bautista i in. 1995, Johnson i in. 2006, inne przykłady w przeglądzie u Tregenza 1995b).

Odwrotnie niż w przypadku badań terenowych, w większości eksperymentów laboratoryjnych nastawiano się raczej na testowanie prognozy koncepcji *IFD* badając rozmieszczenie zwierząt w gradiencie wielkości dostawy/dopływu zasobów (zgodnie ze scenariuszem ang. *continuous input*, Milinski 1979). Eksperymentalnych weryfikacji prognoz modelu *IIFD* jest natomiast niewiele (np. Tregenza i in. 1996). Z kolei dla filtratorów planktonowych, takich jak *Daphnia*, których tempo asymilacji zależy od stężenia pokarmu, a nie od jego dostawy, podjęto próbę weryfikacji prognoz modelowych *IFD* (Jakobsen i Johnsen 1987, Larsson 1997), ale ponownie popełniając ten sam błąd, polegający na zastosowaniu do tego celu błędnego pomieszczenia warunków pokarmowych, charakterystycznych dla scenariusza z modeli interferencyjnych, z wnioskowaniem na temat spodziewanego rozmieszczenia *Daphnia*, charakterystycznego dla scenariusza *continuous input*. Na przykład Larsson (1997) wykazał wprost proporcjonalne rozmieszczenie *Daphnia pulex* w stanie ostatecznie ukształtowanej równowagi w okrężnym, horyzontalnym, układzie przepływowym, w którym stworzony został horyzontalny gradient pokarmu glonowego poprzez jego stałe dozowanie do różnych miejsc okręgu, pionowych dopływów świeżego medium z różnym stężeniem pokarmu (u góry) i odpływów zużytego medium (od dołu). Z eksperymentu tego wynika, że *Daphnia* potrafią szacować stężenie pokarmu i gromadzą się w

miejscu z wyższym jego stężeniem. Podobne spostrzeżenia wynikają z eksperymentów opisanych w innych pracach przeprowadzonych w układach poziomych (np. Jakobsen i Johnsen 1987, Roozen i Lüring 2001) i w terenie (Jensen i in. 2001). Wyniki otrzymane w eksperymentach przeprowadzonych w ramach realizacji projektu mojej rozprawy potwierdzają, że *Daphnia* gromadzą się w wyższym stężeniu pokarmu. Należy jednak zauważyć, że różnica w średniej głębokości wybieranej przez osobniki w tym wariancie i w nieobecności któregośkolwiek gradientu jest mała, co świadczy o tym, że niemal tak samo istotnym czynnikiem decydującym o gromadzeniu się *Daphnia* w górnych warstwach wody, co relatywnie wysokie stężenie pokarmu, jest tendencja do płynięcia w kierunku warstw przypowierzchniowych wynikająca z „pamięci ewolucyjnej”. Możliwe bowiem, że *Daphnia*, żyjąc od pokoleń w jeziorze, w którym najwyższe stężenia pokarmu są w pobliżu powierzchni, mają w jakiś sposób genetycznie uwarunkowany behavior płynięcia do góry w warunkach głodu lub po prostu – przy braku zagrożenia (światła), niezależnie od rzeczywistego gradientu pokarmu. O ile średnie głębokości wybierane przez osobniki, jak również rozkłady głębokości osobników w populacji były podobne w tych dwóch wariantach, o tyle były wyraźne różnice w ruchliwości osobników tak, że o ile osobniki w samym gradiencie pokarmu relatywnie rzadko zmieniały sektor w stanie równowagi dynamicznej, o tyle w nieobecności któregośkolwiek gradientu zmiana ta była bardzo częsta, co sugeruje większą potrzebę *Daphnia* do eksplorowania środowiska w poszukiwaniu lepszego miejsca. Również, w nieobecności któregośkolwiek gradientu, gdy nie działał na *Daphnia* kierunkowy bodziec w postaci gradientu pokarmu, ujawniały się wyraźniej różnice indywidualne w wyborze głębokości.

W eksperymencie Larssona (1997) rozmieszczenie *Daphnia* tylko w znikomym stopniu zależało od zagęszczenia jej populacji, ponieważ było tylko w nieznacznym stopniu bardziej równomierne w wysokim, niż w niskim zagęszczeniu. Wyniki otrzymane w pracy Larssona nie dały więc odpowiedzi na pytanie, dlaczego rozmieszczenie *Daphnia* odzwierciedlało rozmieszczenie pokarmu, choć należałoby się spodziewać, że olbrzymia większość osobników wybierze miejsce z jego największą obfitością. Odpowiedzi na to pytanie dostarczają wyniki otrzymane w ramach mojej rozprawy, które dowodzą, że w dużym stopniu odpowiedzialny za to jest brak perfekcyjnej wiedzy *Daphnia* o zasobności każdego miejsca. Bardziej równomierne rozmieszczenie *Daphnia* w horyzontalnym układzie Larssona, niż w układzie pionowym w eksperymentach opisanych w rozprawie sugeruje, że dodatkowym czynnikiem odpowiedzialnym za relatywnie równomierne rozmieszczenie był brak mobilności *Daphnia* do przemieszczania się w płaszczyźnie horyzontalnej. Ten sam powód

uniemożliwił mi zweryfikowanie hipotezy rozprawy w pierwszym, horyzontalnym, układzie dla badania rozmieszczenia zooplanktonu (*Materiał i metody*, II.2.3.2).

#### **IV.3.3. Porównanie prognoz modelowych i wyników z eksperymentów rzeczywistych w gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy**

W samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy hipoteza nie została potwierdzona, ponieważ rozmieszczenie osobników dojrzałych, i jeszcze wyraźniej osobników młodych, w eksperymentach rzeczywistych, różniło się bardzo wyraźnie od rozmieszczenia wirtualnych osobników w symulacjach tak, że o ile w symulacjach osobniki wybierały dolne sektory, o tyle w eksperymentach rzeczywistych wybierały przede wszystkim sektory pośrednie. Różnica w rozkładach była obecna w każdym z 4 scenariuszy modelu, szczególnie była wyraźna dla scenariuszy z uwzględnieniem II typu odpowiedzi.

Prawdopodobnym czynnikiem odpowiedzialnym za przebywanie *Daphnia* wyżej w słupie wody w eksperymentach rzeczywistych, niż w symulacjach, było (podobnie jak w nieobecności któregośkolwiek gradientu) nieuwzględnienie w predykcjach modelowych „pamięci ewolucyjnej” *Daphnia* do płynięcia w kierunku warstw przypowierzchniowych.

#### **IV.3.4. Porównanie prognoz modelowych i wyników z eksperymentów rzeczywistych w obydwu nakładających się na siebie gradientach**

W nakładających się na siebie gradientach pokarmu glonowego oraz informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy hipoteza została potwierdzona, ponieważ rozmieszczenie *Daphnia* w eksperymentach rzeczywistych, pokryło się z rozmieszczeniem otrzymanym w przynajmniej jednym ze scenariuszy założeń modelowych. O ile duża była różnica w średniej głębokości wybieranej przez *Daphnia* w eksperymentach rzeczywistych i w symulacjach wygenerowanych na podstawie każdego z dwóch scenariuszy zakładających II typ odpowiedzi funkcjonalnej tj. zarówno dla scenariusza zakładającego błąd popełniany przez *Daphnia* przy szacowaniu stężenia pokarmu i natężenia światła, jak również dla scenariusza zakładającego, że *Daphnia* jest „bezbłędna”, o tyle średnia głębokość była podobna dla każdego z dwóch scenariuszy (z „bezbłędną *Daphnia*” i z *Daphnia* popełniającą błędy) zakładających III typ odpowiedzi. Należy podkreślić, że właśnie takiego wyniku należało się spodziewać, ponieważ przebieg ryzyka śmierci od zagęszczenia populacji zooplanktonu wyznaczony w eksperymentach dla parametryzacji modelu był zgodny z III, a nie z II typem odpowiedzi funkcjonalnej. Średnie głębokości wybierane przez *Daphnia* pokryły się zarówno w przypadku osobników młodych, jak również w przypadku osobników

dojrzałych. Zarówno w rozkładach rzeczywistych, jak i w symulacjach, osobniki dojrzałe, jako większe, a tym samym bardziej widoczne dla ryby, przebywały głębiej, w ciemniejszych warstwach słupa wody, szczególnie w wysokim zagęszczeniu ich populacji. Wyniki rozmieszczenia *Daphnia* otrzymane w dwóch gradientach pozwalają więc przypuszczać, że przy wyborze najlepszej dla siebie głębokości, *Daphnia* uwzględnia zarówno zagęszczenie swojej populacji, jak też wielkość swego ciała.

Lepsze dopasowanie rozkładów głębokości rzeczywistych i wirtualnych ujawniło się dla scenariusza modelowego uwzględniającego założenie, że *Daphnia* popełnia błędy przy szacowaniu stężenia pokarmu i natężenia światła (Rys. 25-28 H i P). Eksperymenty polegające na obserwacji wyboru głębokości przez pojedyncze osobniki, wykazały, że *Daphnia*, szczególnie osobniki dojrzałe, w obydwu nakładających się na siebie gradientach częściej, niż w pozostałych trzech wariantach, zmieniały wybieraną głębokość nawet w stanie równowagi w ich rozmieszczeniu, z tym, że ruch ten odbywał się relatywnie (w stosunku do pozostałych wariantów) w niewielkim zakresie głębokości, co sugeruje, że osobniki nieustannie zmieniały decyzje dotyczące kierunku płynięcia, płynąc albo w kierunku warstw przypowierzchniowych dla zwiększenia spodziewanego zysku energetycznego netto, albo płynąc w głąb ze względu na potrzebę unikania potencjalnego ryzyka śmierci ze strony drapieżcy.

Przy weryfikacji hipotezy rozprawy jedynie „opisowo” tj. poprzez interpretację wyników otrzymanych jedynie w eksperymentach rzeczywistych, rzuca się w oczy, że średnia głębokość wybierana przez *Daphnia* była większa w obecności obydwu gradientów, niż w obecności jedynie gradientu informacji o niebezpieczeństwie, pomimo tego, że należało się spodziewać odwrotnej zależności, przy założeniu, że *Daphnia* w wyborze głębokości w samym gradiencie informacji o niebezpieczeństwie (w nieobecności gradientu pokarmu) będzie uwzględniać przede wszystkim potrzebę minimalizacji ryzyka śmierci ze strony drapieżcy. Rozbieżność tę ponownie najłatwiej wyjaśnić istnieniem „pamięci ewolucyjnej” tj. dodatkowej motywacji *Daphnia* do płynięcia w kierunku warstw przypowierzchniowych, która jest tym silniejsza, im jest mniejsze stężenie pokarmu na głębokości, na której znajduje się *Daphnia*.

Według mojej znajomości stanu wiedzy, rozprawa przedstawia pierwszą próbę weryfikacji hipotezy „rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji” w nakładających się na siebie gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy poprzez skonfrontowanie ze sobą pionowego rozmieszczenia *Daphnia* otrzymanego w eksperymentach rzeczywistych z pionowym ich rozmieszczeniem



otrzymanym w ilościowym (matematycznym lub symulacyjnym) modelu optymalizacyjnym. Ilościowe weryfikacje hipotezy, że rozmieszczenie osobników w populacji jest wyrazem indywidualnych decyzji optymalizacyjnych wynikających z konieczności zbilansowania potrzeby maksymalizacji zysku energetycznego netto i potrzeby minimalizacji ryzyka śmierci są nieliczne, nawet po uwzględnieniu badań dla innych grup zwierząt (np. Lima i in. 1985, Gilliam i Fraser 1987). W literaturze przedmiotu można natomiast odnaleźć bardzo liczne prace, w których opisano badania testujące tę hipotezę, ale jedynie za pomocą „modelu opisowego”, czyli poprzez przeprowadzenie eksperymentu rzeczywistego, na podstawie którego zostało wykazane, że zwierzęta uwzględniają w wyborze miejsca zarówno ryzyko śmierci, jak i zasobność środowiska, i że w obecności niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy osobnik wybiera bezpieczniejszą strategię żerowania kosztem zmniejszonego zysku energetycznego netto (np. przegląd u Limy i Dill’a 1990), ale bez wykazania, że jest to najkorzystniejszy możliwy wybór. Badania przeprowadzone w gradientach pokarmu i informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy z wykorzystaniem modelu ilościowego są mniej liczne i polegały na ogół na zastosowaniu dwuetapowej procedury, w której tylko w pierwszym etapie stosowano model ilościowy (na ogół jedną z wersji modelu *IFD*) dla opisu rozmieszczenia zwierząt w samym gradiencie stężenia pokarmu (lub w samym gradiencie dostawy pokarmu). W drugim etapie natomiast wprowadzano do eksperymentu informację (chemiczną lub wizualną) o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (na ogół silniejszą do miejsca zasobniejszego) i wykazywano albo jedynie opisowo, że rozmieszczenie w obecności sygnału o drapieżcy jest inne niż rozmieszczenie, które wynikało jedynie z rozmieszczenia pokarmu (np. Cowlshaw 1997, Heithaus i Dill 2002, Wirsing i in. 2007), albo mierzono tak zwany energetyczny ekwiwalent ryzyka, czyli dodatkową porcję pokarmu (lub dodatkowe stężenie pokarmu), które musi być dodane do miejsca (lub miejsc) z informacją o niebezpieczeństwie tak, aby rozmieszczenie zwierząt powróciło do stanu przed pojawieniem się tej informacji (Abrahams i Dill 1989, Grand i Dill 1997, opis innych przykładów u Browna i Kotlera 2004 i u Maszczyka 2008, Załącznik 1).

#### **IV.4. Wniosek ogólny**

Wyniki otrzymane w ramach realizacji projektu rozprawy nie potwierdziły jednoznacznie prawdziwości hipotezy "rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji", ponieważ jedynie w niektórych sytuacjach (w obydwu nakładających się na siebie gradientach dla obydwu klas wiekowych oraz w gradiencie pokarmu jedynie dla osobników dojrzałych) wyniki (średnich i rozkładów głębokości występowania) otrzymane w

eksperymentach rzeczywistych pokryły się z wynikami otrzymanymi w symulacjach. Najlepsze dopasowanie rozkładów uzyskałem dla symulacji wygenerowanych na podstawie scenariusza zakładającego, że przebieg ryzyka śmierci wraz z zagęszczeniem populacji ofiary jest zgodny z typem III i że *Daphnia* popełniają błędy, szczególnie w szacowaniu tempa wzrostu, w wyniku niekompletnej wiedzy o jakości środowiska. Wydaje się, że różnice w średnich głębokościach (i w rozkładach) w eksperymentach rzeczywistych i w eksperymentach wirtualnych w samym gradiencie pokarmu u młodych osobników mogą wynikać z przecenienia znaczenia błędu popełnianego w szacowaniu stężenia pokarmu przez osobniki młode, wyznaczonego w eksperymentach dla parametryzacji modelu. Natomiast najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem, dlaczego osobniki każdej z dwóch klas wiekowych przebywały bliżej powierzchni w eksperymentach rzeczywistych (niż w symulacjach) w wariantach w nieobecności gradientu pokarmu (w obecności i w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie) jest nieuwzględniona w założeniach modelowych „pamięć ewolucyjna” jako tendencja *Daphnia* do przemieszczania się w kierunku powierzchni wody.

#### **IV.5. Plany na przyszłość**

Dla zwiększenia szansy opublikowania wyników rozprawy w czasopiśmie o wysokiej sile przebicia, zamierzam wzbogacić je o wyniki z dodatkowych eksperymentów przeprowadzonych dla sprawdzenia, czy rozbieżność w rozmieszczeniu *Daphnia* w eksperymentach rzeczywistych przeprowadzonych dla weryfikacji prognoz modelowych i w symulacjach w wariantach w nieobecności gradientu pokarmu (w obecności i w nieobecności gradientu informacji o niebezpieczeństwie) wynikała z „pamięci ewolucyjnej”. Po dodaniu do modelu założenia o „pamięci ewolucyjnej”, zostaną wygenerowane nowe symulacje w kombinacji trzech założeń (a nie tylko dwóch, jak w rozprawie), które zostaną skonfrontowane z wynikami nowej serii eksperymentów rzeczywistych, przeprowadzonych również w dodatkowych dwóch wariantach tj. w wariacie bez gradientu pokarmu, ale z wysokim i takim samym jego stężeniem w całym słupie wody oraz wariacie z samym gradientem informacji o niebezpieczeństwie, ale z wysokim i takim samym stężeniem pokarmu w całym słupie wody.

Badania przeprowadzone w ramach realizacji projektu rozprawy pozwoliły nie tylko na weryfikację hipotezy „rozmieszczenia zooplanktonu wynikającego z indywidualnej optymalizacji”, ale również otworzyły perspektywy dla nowych kierunków badań. Spodziewam się, że skonstruowanie „właściwego” pionowego układu eksperymentalnego dla

badania rozmieszczenia zooplanktonu (Maszczyk 2016), pozwoli w niedalekiej przyszłości na zweryfikowanie kilku nowych hipotez, w tym również postulatu, że typowe rozmieszczenie zwierząt planktonowych w słupie wody jeziora lub oceanu z maksimum zagęszczenia na pośrednich głębokościach (znajdującego się niżej w dzień niż w nocy wskutek dobowych migracji pionowych) jest efektem takiego przemieszczania się osobników populacji *Daphnia*, które prowadzi do tego, że każdy osobnik znajduje się na takiej głębokości, na której zrealizować może swoje najwyższe możliwe dostosowanie wynikające z odnalezienia miejsca z optymalnym kompromisem pomiędzy maksymalnym możliwym tempem wzrostu (i reprodukcji) w pionowych gradientach temperatury i pokarmu, oraz minimalnym ryzykiem śmierci ze strony drapieżcy, ryby planktonożernejszej posługującej się wzrokiem przy lokalizacji ofiary w gradiencie natężenia i spektrum światła. Hipoteza ta różni się od hipotezy postawionej w rozprawie tym, że odnosi się do konkretnych warunków w jeziorze. Przy założeniu, że o rozmieszczeniu zooplanktonu w jeziorze decydują przede wszystkim trzy gradienty (pokarmu, temperatury i niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy posługującego się wzrokiem), hipoteza ta prognozuje, że pionowe rozmieszczenie zooplanktonu w eksperymentach dla weryfikacji prognoz modelowych, będzie z jednej strony odzwierciedlać rozmieszczenie zooplanktonu w konkretnym scenariuszu z jeziora (w konkretnym czasie i w konkretnym jeziorze), gdy warunki trzech gradientów w eksperymentach będą wiernie odzwierciedlać kombinacje tych gradientów z wybranego scenariusza, a z drugiej strony, będzie odzwierciedlać wyniki symulacji powstałe wskutek założeń modelu optymalizacyjnego.

## V. Piśmiennictwo

- Abrahams M.V. 1986 – Patch choice under perceptual constraints: a cause for departures from the IFD – Behav. Ecol. Sociobiol. 10: 409–415.
- Abrahams, M.V., Dill L.M. 1989 – A determination of the energetic equivalence of the risks of predation – Ecology 70 :999–1007.
- Akaike H. 1974 – A New Look at Statistical Model Identification – IEEE Trans. Automatic Control 19: 716–723.
- Aksnes D.L., Giske J. 1993 – A theoretical model of aquatic visual feeding – Ecol. Model. 67: 233–250.

- Bartosiewicz M., Gliwicz Z.M. 2011 – Temporary intermissions in capturing prey (*Daphnia*) by planktivorous fish (*Rutilus rutilus*): Are they due to scramble competition or the need for antipredation vigilance? – *Hydrobiologia* 668: 125–136.
- Bartosiewicz M., Jabłoński J., Kozłowski J., Maszczyk P. 2015 – Does limited space for carrying eggs explain indeterminate growth in *Daphnia*? – *Journal of Plankton Research*. 37: 417–428.
- Bates D., Maechler M., Boler B., Walker S. 2015 – Lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version. 1: 1–9.
- Bautista L.M., Alonso J.C., Alonso J.A. 1995 – A field test of ideal free distribution in flock-feeding common cranes – *J. Anim. Ecol.* 64: 747–757.
- Beklioglu M., Gozen A.G., Yildirim F., Zorlu P., Onde S. 2008 – Impact of food concentration on diel vertical migration behaviour of *Daphnia pulex* under fish predation risk – *Hydrobiologia* 614: 321–327.
- Bence J.R., Murdoch W.W. 1986 – Prey size selection by the mosquitofish: Relation to optimal diet theory – *Ecology* 67: 324–336.
- Bottrell H.H., Duncan A., Gliwicz Z.M., Grygierek E., Herzig A., Hillbricht-Ilkowska A., Kurasawa H., Larsson P., Węgleńska T. 1976 – A review of some problems in zooplankton production studies – *Norw. J. Zool.* 24: 419–456.
- Brown J.S., Kotler B.P. 2004 – Hazardous duty pay and the foraging cost of predation – *Ecol. Lett.* 7: 999–1014.
- Blukacz E.A., Sprules W.G., Shuter B.J., Richards J.P. 2010 – Evaluating the effect of wind-driven patchiness on trophic interactions between zooplankton and phytoplankton – *Limnol. Oceanogr.* 55: 1590–1600.
- Bukovinszky T., Helmsing N.R., Grau R.A., Bakker E.S., Bezemer T.M., Vos M., Uittenhout H., Verschoor A.M. 2013 – A device to study the behavioral responses of zooplankton to food quality and quantity – *J. Insect Behav.* 26: 453–465.
- Charnov E.L. 1976 – Optimal foraging: the marginal value theorem – *Theor. Popul. Biol.* 9: 129–136.
- Cowgill U.M., Keating K.I., Takahashi. I.T. 1985 – Fecundity and longevity of *Ceriodaphnia dubia/affinis* in relation to diet at two different temperatures – *J. Crust. Biol.* 5:420–429.
- Cowlshaw G. 1997 – Trade-off between foraging and predation risk determine habitat use in a desert baboon population – *Anim. Behav.* 53: 667–686.
- Dawidowicz P., Loose C.J. 1992 – Metabolic costs during predator-induced diel vertical migration of *Daphnia* – *Limnol. Oceanogr.* 37: 1589–1595.

- Dawidowicz P. 1993 – Diel vertical migration in *Chaoborus flavicans*: Population patterns vs. individual tracks – Arch. Hydrobiol. 39: 19–28.
- DeAngelis D.L., Grimm V. 2014 – Individual-based models in ecology after four decades – F1000 Prime Rep. 6: 39.
- De Meester L., Weider L.J., Tollrian R. 1995 – Alternative antipredator defences and genetic polymorphism in a pelagic predator–prey system – Nature 378: 483–485.
- De Meester L., Dawidowicz, P., Van Gool E., Loose C.J. 1999 – Ecology and Evolution of Predator-Induced Behavior of Zooplankton: Depth Selection Behavior and Diel Vertical Migration. In: Tollrian R. and C.D. Harvell (eds). The Ecology and Evolution of Inducible Defenses. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- De Robertis A. 2002 – Size-dependent visual predation risk and the timing of vertical migration: An optimization model – Limnol. Oceanogr. 47: 925–933.
- Domenici P., Blake R.W. 1997 – The kinematics and performance of fish fast-start swimming – J. Exp. Biol. 200: 1165–1178.
- Eggers D.M. 1977 – The nature of prey selection by planktivorous fish – Ecology 58: 46–59.
- Emlen J.M. 1966 – The role of time and energy in food preference – Am. Nat. 100: 611–617.
- Englund G., Cooper S.D. 2003 – Scale effects and extrapolation in ecological experiments – Adv. Ecol. Res. 33: 161–213.
- Fiksen Ø. 1997 – Allocation patterns and diel vertical migration: modeling the optimal *Daphnia* – Ecology 78: 1446–1456.
- Folt C.L., Burns C. W. 1999 – Biological drivers of zooplankton patchiness – Trends Ecol. Evol. 14: 300–305.
- Fretwell S.D. 1972 – Populations in seasonal environments – Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Fretwell S.D., Lucas H.L. 1970 – On territorial behavior and other factors influencing habitat distribution in birds. I. Theoretical development – Acta Biotheor. 19: 16–36.
- Galarowicz T.L., Wahl D.H. 2005 – Foraging by a young-of-the-year piscivore: the role of predator size, prey type, and density – Can. J. Fish. Aquat. Sci. 62: 2330–2342.
- Gendron R.P., Staddon J.E.R. 1983 – Searching for cryptic prey: The effect of search rate – Am. Nat. 121: 172–186.
- Gilliam J.F., Fraser D.F. 1987 – Habitat selection under predation hazard: test of a model with stream-dwelling minnows – Ecology 68: 1856–1862.
- Giske J., Rosland R., Berntsen J., Fiksen Ø. 1997 – Ideal free distribution of copepods under predation risk – Ecol. Model. 95: 45–59.

- Gliwicz Z.M. 1999 – Pomiedzy perspektywą głodu a zagrożeniem ze strony drapieżcy: ekologia zwierzęcia wód otwartych – Kosmos 48: 405–424.
- Gliwicz Z.M. 2003 – Between hazards of starvation and risk of predation: the ecology of offshore animals – Excellence in Ecology 12, International Ecology Institute, Oldendorf/Luhe, Germany.
- Gliwicz Z.M., Dawidowicz P., Maszczyk P. 2006a – Low-density anti-predation refuge in *Daphnia* and *Chaoborus*? – Arch. Hydrobiol. 167: 101–114.
- Gliwicz Z.M., Słoń J., Szynkarczyk I. 2006b – Trading safety for food: evidence from gut contents in roach and bleak captured at different distances offshore from their daytime littoral refuge – Freshwat. Biol. 51: 823–839.
- Gliwicz Z.M., Wrzosek D. 2008 – Predation-mediated coexistence of large- and small-bodied *Daphnia* at different food levels – Am. Nat. 172: 358–374.
- Gliwicz Z. M., Maszczyk P., Jabłoński J., Wrzosek D. 2013 – Patch exploitation by planktivorous fish and the concept of aggregation as an antipredation defense in zooplankton – Limnol. Oceanogr. 58: 1621–1639.
- Gliwicz Z.M., Maszczyk P., Uszko W. 2012 – Enhanced growth at low population density in *Daphnia*: the absence of crowding effects or relief from visual predation? – Freshwat. Biol. 57: 1166–1179.
- Godin J.J.G., Smith S.A. 1988 – A fitness cost of foraging in the guppy – Nature 333: 69–71.
- Grand T.C., Dill L.M. 1997 – The energetic equivalence of cover to juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): ideal free distribution theory applied – Behav. Ecol. 8: 437–447.
- Guisande C., Duncan A., Lampert W. 1991 – Trade-offs in *Daphnia* vertical migration strategies – Oecologia 87: 357–359.
- Harris J.E., Wolfe U.K. 1955 – A laboratory study of vertical migration – Proc. Roy. Soc. London, B 144: 329–354.
- Hays G.C., Kennedy H., Frost B.W. 2001 – Individual variability in diel vertical migration of a marine copepod: why some individuals remain at depth when others migrate – Limnol. Oceanogr. 46: 2050–2054.
- Heithaus M.R., Dill L.M. 2002 – Food availability and tiger shark predation risk influence bottlenose dolphin habitat use – Ecology 83: 480–491.
- Heller R., Milinski M. 1979 – Optimal foraging of sticklebacks on swarming prey – Anim. Behav. 27: 1127–1141.
- Holling C.S. 1959 – The components of predation as revealed by a study of small-mammal predation of the European pine sawfly – Can. Ent. 91: 293–320.

- Hunter J.R., Thomas G.L. 1974 – Effect of prey distribution and density on the searching and feeding behavior of larval anchovy *Engraulis mordax* Girard, p. 559–574. In J. H. S. Blaxter [ed.], The early life history of fish. Springer-Verlag.
- Huntley M., Brooks E.R. 1982 – Effects of age and food availability on diel vertical migration of *Calanus pacificus* – Mar. Biol. 71: 23–31.
- Itoh A., Hisama H. 2010 – Motion control of *Daphnia magna* by blue LED light – J. Aero. Aqua. Bio-mechanisms 1: 93–98.
- Ivlev V.S. 1961 – Experimental ecology of the feeding of fishes – Yale Univ.
- Jachner, A. 1991 – Food and habitat partitioning among juveniles of three fish species in the pelagial of a mesotrophic lake – Hydrobiologia 226: 81–89.
- Jakobsen P.J., Johnsen G.H. 1987 – Behavioural response of the water flea *Daphnia pulex* to a gradient in food concentration – Anim. Behav. 35: 1891–1895.
- Jensen K.H., Larsson P., Högstedt G. 2001 – Detecting food search in *Daphnia* in the field – Limnol. Oceanogr. 46: 1013–1020.
- Johnson C.A., Giraldeau L.A., Grant J.W.A. 2006 – Intensity of interference affects the distribution of house sparrows, *Passer domesticus*, at food patches – Anim. Behav. 71: 965–970.
- Kajak. Z. 1998 – Hydrobiologia – limnologia. Ekosystemy wód śródlądowych – Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Kessler K., Lampert W. 2004a – Fitness optimization in *Daphnia* in a trade-off between food and temperature – Oecologia 140: 381–387.
- Kessler K., Lampert W. 2004b – Depth distribution of *Daphnia* in response to a deep-water algal maximum: the effect of body size and temperature gradient – Freshwat. Biol. 49: 392–401.
- Koski M.L., Johnson B.M. 2002 – Functional response of kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka*) to *Daphnia* at different light levels – Can. J. Fish. Aquat. Sci. 59: 707–716.
- Krebs J.R., Davies N.B. 2001 – Wprowadzenie do ekologii behawioralnej – Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
- Lampert W. 2005 – Vertical distribution of zooplankton: density dependence and evidence for an ideal free distribution with costs – BMC Biol. 3: 1–10.
- Lampert W. 2011 – *Daphnia*: Development of a model organism in ecology and evolution. In: Kinne O. (Ed.), Excellence in ecology, Book 21. International Ecology Institute, Oldendorf/Luhe.

- Lampert W., Schmitt R. D., Muck P. 1988 – Vertical migration of freshwater zooplankton: test of some hypotheses predicting a metabolic advantage – *Bull. Mar. Sci.* 43: 620–640.
- Lampert W., Loose C. J. 1992 – Plankton towers: Bridging the gap between laboratory and field experiments – *Arch. Hydrobiol.* 126: 53–66.
- Lampert W., McCauley E., Manly B. 2003 – Trade-offs in the vertical distribution of zooplankton: ideal free distribution with costs? – *Proc. R. Soc. Lond. B* 270: 765–773.
- Lampert W., Sommer U. 2007 – *Limnoecology – the ecology of lakes and streams* – Oxford University Press, New York.
- Lampert W., Trubetskova I. 1996 – Juvenile growth rate as a measure of fitness in *Daphnia* – *Funct. Ecol.* 10: 631–635.
- Larsson P. 1997 – Ideal free distribution in *Daphnia*? Are daphnids able to consider both the food patch quality and the position of competitors? – *Hydrobiologia* 360: 143–152.
- Larsson P., Lampert W. 2012 – Finding the optimal vertical distribution: behavioural responses of *Daphnia pulicaria* to gradients of environmental factors and the presence of fish. – *Freshwat. Biol.* 57: 2514–2525.
- Lima S., Dill L.M. 1990 – Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus – *Can. J. Zool.* 68: 619–640.
- Lima S., Valone T.J., Caraco T. 1985 – Foraging-efficiency – predation-risk tradeoff in the gray squirrel – *Anim. Behav.* 33: 155–165.
- Loose C.J., Von Elert E., Dawidowicz P. 1993 – Chemically induced diel vertical migration in *Daphnia* - a new bioassay for kairomones exuded by fish – *Arch. Hydrobiol.* 126: 329–337.
- Loose C.J., Dawidowicz P. 1994 – Trade-offs in diel vertical migration by zooplankton: the costs of predator avoidance – *Ecology* 75: 2255–2263.
- MacArthur R.H., Pianka E.R. 1966 – On optimal use of a patchy environment – *Am. Nat.* 100: 603–609.
- Macháček J. 1993 – Comparison of the response of *Daphnia galeata* and *Daphnia obtusa* to fish-produced chemical substance – *Limnol. Oceanogr.* 38: 1544–1550.
- Marshall J., Arikawa K. 2014 – Unconventional colour vision – *Curr. Biol.* 24: 1150–1154.
- Maszczyk P. 2008 – Koncepcja rozmieszczenia idealnie swobodnego: czy tylko zasoby? – *Wiad. Ecol.* 54: 113–141.
- Maszczyk P. 2016 – Miniature plankton columns to study zooplankton depth distribution at gradients of food, predation risk, temperature, and UV radiation – *Limnology and Oceanography Methods* 14: 210–223.



- Maszczyk P., Gliwicz Z.M. 2014 – Selectivity by planktivorous fish at different prey densities, heterogeneities and spatial scales – *Limnol. Oceanogr.* 59: 68–78.
- Maszczyk P., Bartosiewicz M., Jurkowski J.E., Wyszomirski T. 2014 – Temperature, prey density and interference competition in a planktivorous fish (*Rutilus rutilus*) – *Limnology* 15:155-162.
- Maszczyk, P., Bartosiewicz, M. 2012 – Threat of treat: the role of fish exudate in the growth and life history of *Daphnia* – *Ecosphere* 3 (10): 1–19.
- McLaren I.A. 1974 – Demographic strategy of vertical migration by a marine copepod – *Am. Nat.* 108: 91–102.
- Milinski M. 1979 – An evolutionary stable feeding strategy in sticklebacks – *Z. Tierpsychol.* 51: 36–40.
- Milinski M. 1994a – Long-term memory for food patches and implications for ideal free distributions in sticklebacks – *Ecology* 75: 1150–1156.
- Milinski M. 1994b – Ideal free theory predicts more than only input matching – a critique of Kennedy and Gray’s review – *Oikos* 71: 163–166.
- Milinski M., Heller R. 1978 – Influence of a predator on the optimal foraging behaviour of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) – *Nature* 275: 642–644.
- Milinski M., Regelman K. 1985 – Fading short-term memory for patch quality in sticklebacks – *Anim. Behav.* 33: 678–680.
- Moody A.L., Houston A.I., McNamara J.M. 1996 – Ideal free distributions under predation risk – *Behav. Ecol. Sociobiol.* 38: 131–143.
- Munk P., Kiørboe T. 1985 – Feeding behavior and swimming activity of larval herring *Clupea harengus* in relation to density of copepod nauplii – *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 24: 15–21.
- Murray G.P.D., Stillman R.A., Gozlan R.E., Britton J.R. 2013 – Experimental predictions of the functional response of a freshwater fish – *Ethology* 119: 751–761.
- Neary J., Cash K., McCauley E. 1994 – Behavioural aggregation of *Daphnia pulex* in response to food gradients – *Funct. Ecol.* 8: 377–383.
- Orcutt J.R., Porter K.G. 1984 – The synergistic effects of temperature and food concentration on life history parameters of *Daphnia* – *Oecologia* 63: 300–306.
- Pennak R.W. 1989 – Fresh-water invertebrates of the United States. 3rd ed. Protozoa to Mollusca. John Wiley & Sons, New York, NY.

- Petrusek A., Hobaek A., Nilssen J.P., Skage M., Cerny M., Brede N., Schwenk K. 2008 – A taxonomic reappraisal of the European *Daphnia longispina* complex (Crustacea, Cladocera, Anomopoda) – Zool. Scr. 37: 507–519.
- Pinel-Alloul B. 1995 – Spatial heterogeneity as a multiscale characteristic of zooplankton community – Hydrobiologia 301: 17–42.
- Power M.E. 1984 – Habitat quality and the distribution of algae-grazing catfish in a Panamanian stream – J. Anim. Ecol. 53: 357–374.
- Price H.J. 1989 – Swimming behavior of krill in response to algal patches: A mesocosm study – Limnol. Oceanogr. 34: 649–659.
- Ranta E., Lundberg P., Kaitala V. 1999 – Resource matching with limited knowledge – Oikos, 86: 383–385.
- Rhode S.C., Pawlowski M., Tollrian R. 2001 – The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia* – Nature 412: 69–72.
- Ringelberg J., Kasteel J. van, Servaas H. 1967 – The sensitivity of *Daphnia magna* Straus to changes in light intensity at various adaptation levels and its implication in diurnal vertical migration – Zeits.Vergl. Physiol. 56: 397–407.
- Roozen F., Lürling M. 2001 – Behavioural response of *Daphnia* to olfactory cues from food, competitors and predators – J. Plankton Res. 23: 797–808.
- Ruzicka J.J., Gallager S.M. 2006 – The saltatory search behavior of larval cod (*Gadus morhua*) – Deep-Sea Res. II 53: 2735–2757.
- Rygielska-Szymańska E. 2009 - W jakim stopniu struktura wiekowa populacji *Daphnia* odzwierciedla selektywną presję drapieżnika - ryby planktonożerne? – Rozprawa doktorska Uniwersytet Warszawski.
- Sekino T., Yamamura N. 1999 – Diel vertical migration of zooplankton: optimum migrating schedule based on energy accumulation – Evol Ecol. 13: 267–282.
- Smith F.E., Baylor E.R. 1953 – Color responses in the Cladocera and their ecological significance – Am. Nat. 49–55.
- Smith M.J., Price G.R. 1973 – The logic of animal conflict – Nature, Lond. 246: 15–16.
- Smith K., Macagno E.R. 1990 – UV photoreceptors in the compound eye of *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda). A fourth spectral class in a single ommatidia – J. Comp. Physiol. A 166: 597–606.
- Stich H.B., Lampert W. 1981 – Predator evasion as an explanation of diurnal migration by zooplankton – Nature 293: 396–398.

- Storz U.C., Paul R.J. 1998 – Phototaxis in water fleas (*Daphnia magna*) is differently influenced by visible and UV light – J. Comp. Physiol. A 183: 709–717.
- Sutherland W.J. 1983 – Aggregation and the “ideal free” distribution – J. Anim. Ecol. 52: 821–828.
- Ślusarczyk M., Pinel-Alloul B. 2010 – Depth selection and life history strategies as mutually exclusive responses to risk of fish predation in *Daphnia* – Hydrobiologia 643: 33–41.
- Tarling G.A., Matthews J.B.L., Burrows M., Saborowski R., Buchholz F., Bedo A., Mayzuad P. 2000 – An optimisation model of the diel vertical migration of ‘Northern krill’ (*Meganyctiphanes norvegica*) in the Clyde Sea and Kattegat – Can. J. Fish. Aquat. Sci. (Suppl 3) 57: 38 – 50.
- Townsend C.R., Risebrow A.J., 1982 – The influence of light level on the functional response of a zooplankton on fish – Oecologia 53: 293–295.
- Tregenza T. 1995a – Common misconceptions in applying the ideal free distribution – Anim. Behav. 47: 485–487.
- Tregenza T. 1995b – Building on the ideal free distribution – Adv. Ecol. Res. 26: 253–307.
- Tregenza T., Thompson D.J., Parker G.A. 1996 – Interference and the ideal free distribution: Oviposition in a parasitoid wasp – Behav. Ecol. 7: 387–394.
- Tyler J.A., Gilliam J.F. 1995 – Ideal free distributions of stream fish: a model and test with minnows, *Rhinichthys atratulus* – Ecology 76: 580–592.
- Vollset K.W., Bailey K.M. 2011 – Interplay of individual interactions and turbidity affects the functional response of three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* – J. Fish. Biol. 78: 1954–1964.
- Ware D.M. 1978 – Bioenergetics of pelagic fish: theoretical change in swimming speed and ration with body size – J. Fish. Res. Board Can. 35: 220–228.
- Werner E.E., Gilliam J.F. 1984 – The ontogenetic niche and species interactions in size-structured populations – Annu. Rev. Ecol. Syst. 15: 393–426.
- Williamson C.E., Sanders R.W., Moeller R.E., Stutzman, P.L. 1996 – Utilization of subsurface food resources for zooplankton reproduction: Implications for diel vertical migration theory – Limnol. Oceanogr. 41: 224–233.
- Winder M., Spaak P., Mooij W.M. 2004 – Trade-offs in *Daphnia* habitat selection – Ecology 85: 2027–2036.
- Winkler H., Orellana C.P. 1992 – Functional responses of five cyprinid species to planktonic prey – Environ. Biol. Fishes 33: 53–62.

- Wirsing A.J., Heithaus M.R., Dill L.M. 2007 – Fear factor: do dugongs (*Dugong dugon*) trade food for safety from tiger sharks (*Galeocerdo cuvier*)? – *Oecologia* 153: 1031–1040.
- Zaret T.M., Suffern J.S. 1976 – Vertical migration in zooplankton as a predator avoidance mechanism – *Limnol. Oceanogr.* 21: 804–813.

**W rozprawie uwzględnione zostały tylko najważniejsze referencje, dodatkowe referencje dotyczące treści rozprawy oraz te dotyczące zagadnień pobocznych zostały zacytowane w publikacjach dołączonych do rozprawy.**

## **VI. Załączniki**

## **VI.1. Załącznik 1**

Maszczyk P. 2008 – Koncepcja rozmieszczenia idealnie swobodnego: czy tylko zasoby? –Wiadomości Ekologiczne 54: 113–141.

**Piotr Maszczyk**

Zakład Hydrobiologii

Instytutu Zoologii

Uniwersytetu Warszawskiego

ul. Banacha 2

02-097 Warszawa

e-mail: popo2@hydro.biol.uw.edu.pl

**Koncepcja rozmieszczenia  
idealnie swobodnego:  
czy tylko zasoby?**  
Ideal free distribution:  
food limitation alone?**1. Wstęp**

Koncepcja rozmieszczenia idealnie swobodnego, znana w piśmiennictwie jako *ideal free distribution* lub *IFD* (Fretwell i Lucas 1970, Fretwell 1972), przewiduje optymalne dla każdego osobnika rozmieszczenie zwierząt w gradiencie zasobów. Nie uwzględnia ona tego, że rozmieszczenie to może być modyfikowane przez inne czynniki środowiska, na przykład niebezpieczeństwo ze strony drapieżcy.

Na ogół koncepcja *IFD* testowana jest w gradiencie pokarmu, ale są również nie-liczne prace, w których testowano rozmieszczenie zwierząt względem innych zasobów niż pokarm (np. rozmieszczenie samców ropuch *Bufo bufo* zależnie od zagęszczenia gotowych do reprodukcji samic, Davies i Halliday 1979 i rozmieszczenie samic much *Scathophaga stercoraria* względem atrakcyjnych miejsc do złożenia jaj, Blanckenhorn i in. 2000).

Wśród założeń oryginalnej koncepcji *IFD* najważniejsze jest to, że każdy osobnik w populacji:

**po pierwsze**, precyzyjnie szacuje zasobność środowiska (*ideal*) wybierając takie miejsce, w którym może skonsumować najwięcej zasobów i tym samym najszybciej rosnać, produkując największą liczbę płodnego potomstwa (maksymalizacja dostosowania, Stephens i Krebs 1986);

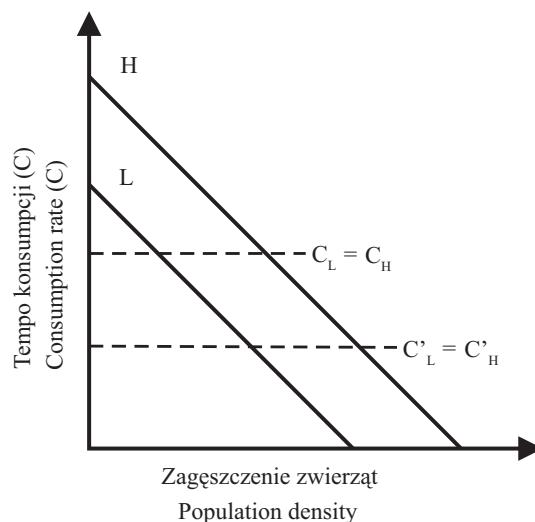
**po drugie**, może swobodnie przemieszczać się z jednego miejsca do drugiego (*free*) bez ponoszenia żadnych wydatków energetycznych na to przemieszczanie;

**po trzecie**, ma takie same zdolności konkurencyjne jak inne osobniki;

**po czwarte**, w żadnym miejscu nie zmienia się obfitość zasobów (tempo ich produkcji równe jest tempu ich eksploatacji).

Przy spełnieniu powyższych założeń koncepcja *IFD* przewiduje, że każdy osobnik będzie poszukiwał dla siebie optymalnego miejsca dopóki nie ustali się dynamiczna równowaga w rozmieszczeniu zwierząt w populacji, w której lokalne ich zagęszcze-

nie odzwierciedlać będzie zasobność środowiska (w każdym miejscu zagęszczenie powinno być wprost proporcjonalne do obfitości pokarmu tam występującego) zarówno wtedy, gdy zagęszczenie populacji będzie dalekie, jak też, gdy będzie bliskie poziomowi pojemności środowiska (rys. 1, 2A). Natomiast dostosowanie każdego osobnika, mierzone ilością konsumowanych zasobów w jednostce czasu, będzie największe możliwe w danej koncentracji zasobów i zagęszczenia populacji oraz takie samo w miejscu o niskiej i wysokiej podaży tych zasobów (rys. 1, 2A). Tempo konsumpcji zasobów będzie takie samo w miejscach o różnej zasobności zarówno wtedy, gdy zagęszczenie populacji będzie dalekie od poziomu pojemności środowiska, jak również wtedy, gdy będzie bliskie. Równowaga w rozmieszczeniu idealnie swo-

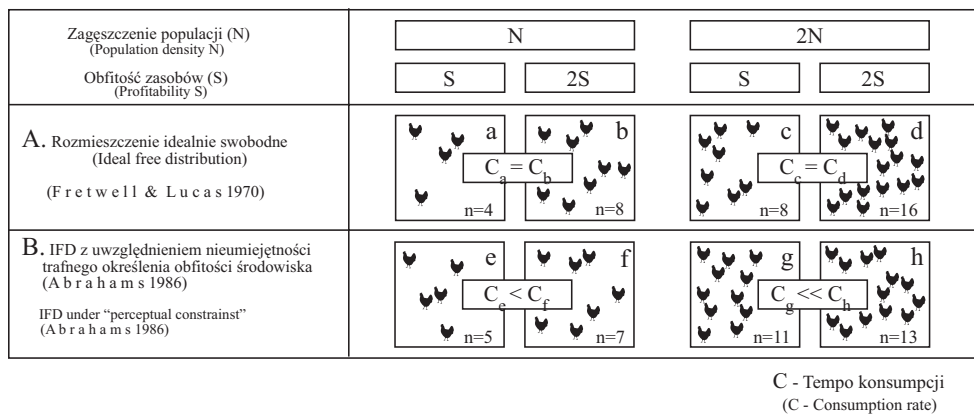


**Rys. 1.** Tempo konsumpcji zasobów (C) przez osobniki tej samej populacji w miejscach o różnej zasobności, niższej (L) i wyższej (H), i wynikających stąd różnych zagęszczeniach tej populacji według oryginalnego modelu rozmieszczenia idealnie swobodnego (IFD) zmodyfikowanego wg rysunku Fretwella i Lucasa (1970). Od chwili osiągnięcia równowagi dynamicznej, każdy osobnik konsumuje taką samą ilość zasobów w miejscu o wysokiej podaży zasobów (H) i miejscu o podaży niskiej (L). Dzieje się tak zarówno wtedy, gdy populacja jest daleka od osiągnięcia poziomu pojemności środowiska (K, czyli punktów przecięcia prostej H i prostej L z osią odciętych, wtedy  $C_L = C_H$ ), jak również wtedy, gdy jest bliska ( $C'_L = C'_H$ )

Fig. 1. Original model of ideal free distribution (IFD) according to Fretwell and Lucas (1970, modified) between more (H), and less (L) profitable habitats (patches). In an IFD equilibrium situation, the mean individual consumption rate (C) is equal at both low and high patch profitability. It remains equal over a wide range of population density levels (for example  $C_L = C_H$  and  $C'_L = C'_H$ )

bodnym jest ewolucyjnie stabilna (Cressman i in. 2004), czyli w stanie tej równowagi żaden osobnik nie może zwiększyć swojego dostosowania przemieszczając się do innego miejsca w środowisku (Parker 1984, Morris 2006).

Liczba prac traktująca o koncepcji *IFD* oraz jej modyfikacjach znacznie przekracza 500 pozycji w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej i doczekała się już licznych syntez (Milinski i Parker 1991, Kacelnik i in. 1992, Kennedy i Gray 1993, Tregenza 1995, Schilling 2005), a nawet opracowania książkowego (Sutherland 1996). W polskojęzycznej literaturze naukowej temat koncepcji *IFD* zdaje się nie istnieć (wyjątkiem jest ogólny tekst poświęcony tej koncepcji w polskim wydaniu podręcznika Krebsa i Daviesa z roku 2001). Wobec tego w pierwszej części tego



**Rys. 2.** Rozmieszczenie idealnie swobodne zwierząt (Fretwell i Lucas 1970, A) oraz rozmieszczenie idealnie swobodne zwierząt z uwzględnieniem nieumiejętności trafego określenia zasobności środowiska (B) w niskim (a, b oraz e, f) i w wysokim (c, d oraz g, h) zagęszczeniu populacji (rysunek oryginalny). Jedynie w rozmieszczeniu wynikającym z oryginalnego modelu *IFD* konsumpcja (C) jest taka sama w miejscu mniej (a, c) i bardziej (b, d) zasobnym. Jest tak zarówno przy niskim (a, b) jak i wysokim (c, d) zagęszczeniu populacji. W modelu *IFD* zakładającym brak umiejętności trafego określenia zasobności środowiska, konsumpcja jest większa w miejscu bardziej zasobnym (f, h), a rozmieszczenie zwierząt bardziej równomierne, niż przewiduje to oryginalna koncepcja *IFD*

Fig. 2. Examples of the ideal free distribution of an animal population according to the original IFD model (A), and the ideal free distribution of individuals that are unable to correctly assess the resource profitability of a given patch of their habitat („perceptual constraints” of Abrahams 1986, B), at low (a, b and e, f) and high (c, d and g, h) population density levels (original figure). Note that the difference in density is lower in the latter situation (B) than in the former (A). Only in the former case (A), is the individual consumption rate (C) the same in the more and the less profitable patches, both at low (a, b) and high (c, d) population density levels



artykułu (rozdziały 1–3) chciałbym przybliżyć polskiemu czytelnikowi ten ciekawy wątek współczesnej ekologii i zastanowić się nad przydatnością koncepcji *IFD* w opisie optymalnego dla każdego osobnika rozmieszczenia zwierząt w gradiencie pokarmu.

Z bogatej literatury przedmiotu wiadomo, że dostosowanie zwierząt zależy nie tylko od tempa konsumpcji pokarmu, ale również od kosztów pozyskiwania tego pokarmu (Lima i Dill 1990, Lampert i Sommer 1997, Krebs i Davies 2001, Gliwicz 2003). Wobec tego spodziewać się należy, że rozmieszczenie tych kosztów modyfikuje rozmieszczenie idealnie swobodne w gradiencie zasobów.

Chociaż oryginalna koncepcja *IFD* nic nie mówi o tym, jak koszty pozyskiwania pokarmu wpływają na wybór miejsca żerowania zwierząt, to jednak ze względu na swoje proste założenia jest dobrym punktem wyjścia do rozważań na temat optymalnego dla każdego osobnika rozmieszczenia w nakładającym się wzajemnie gradiencie pokarmu i gradiencie natężenia innej cechy środowiska odpowiedzialnej za spowalnianie tempa wzrostu i rozrodu. Każda niekorzystna cecha środowiska (np. zasolenie, obecność substancji toksycznych, zbyt niska temperatura, niebezpieczeństwo ze strony drapieżcy) powoduje dodatkowe koszty, jakie ponosić musi każdy osobnik. Koszty te mogą wpływać na obie składowe dostosowania (redukcję asymilację  $A$  albo zwiększając respirację  $R$ ) mierzonego jako  $P$  (indywidualnego tempa wzrostu i reprodukcji osobnika,  $P = A - R$ ). O ile koszty energetyczne wynikające z konieczności radzenia sobie z niekorzystnym oddziaływaniem czynników abiotycznych zostały już wprowadzone do oryginalnego modelu *IFD* (*ideal free distribution with costs*, Tyler i Gilliam 1995) i na wielu przykładach przetestowane eksperymentalnie (Webster 2006), o tyle jedynie nieliczne przykłady dotyczą modelowego i eksperymentalnego sprawdzenia, jakie znaczenie w modyfikowaniu rozmieszczenia idealnie swobodnego ma spowalnianie indywidualnego tempa wzrostu i reprodukcji osobnika wskutek konieczności unikania niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy oraz ryzyko śmierci powodowane przez drapieżniki. Jest to zaskakujące, ponieważ umiejętność unikania tego niebezpieczeństwa jest drugą podstawową (obok umiejętności zdobywania zasobów) składową dostosowania. Wobec tego w drugiej części artykułu (rozdziały 4–5) chciałbym zastanowić się nad tym, jak koszty pozyskiwania pokarmu zmieniają rozmieszczenie idealnie swobodne zwierząt w populacji ze szczególnym uwzględnieniem modyfikacji rozmieszczenia *IFD* przez gradient niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy.

## 2. Dlaczego większość przykładów potwierdzających rozmieszczenie idealnie swobodne dotyczy zwierząt wodnych?

Koncepcja *IFD* została sformułowana na przykładzie rozmieszczenia ptaków hodowlanych (Fretwell i Lucas 1970), natomiast większość późniejszych prac laboratoryjnych i terenowych testujących tę koncepcję przeprowadzona została na zwierzętach związanych ze środowiskami wodnymi, przede wszystkim na rybach (*Gasterosteus aculeatus*, Milinski 1979, 1984b, *Aequidens curviceps*, Godin i Keenleyside 1984, *Ancistus spinosus*, Power 1984, *Poecilia reticulata*, Dill 1987, Abrahams 1989, *Spinachia spinachia*, Croy i Hughes 1991, Gotceitas i Colgan 1991, *Esox lucius*, Haugen i in. 2006), ptakach wodnych (*Anas platyrhynchos*, Harper 1982), płazach (kijanki żab *Rana temporalis*, Veeranagoudar i in. 2004) i zwierzętach planktonowych (Larsson 1997, Jensen i in. 2001).

W tak jednorodnym środowisku, jak powierzchnia wody, czy słup wody w pelagialu jeziornym, zwierzęta są mobilne, czyli swobodnie się przemieszczają i szybko ustala się między osobnikami populacji równowaga dynamiczna w ich rozmieszczeniu. Ponieważ testowanie koncepcji *IFD* jest najłatwiejsze w toni wodnej (bez skomplikowanych struktur przestrzennych budowanych przez roślinność w litoralu) i łatwo zrekonstruować to środowisko w laboratorium, to najlepszymi obiektami do tych badań są zwierzęta zamieszkujące to środowisko (ryby i zwierzęta planktonowe).

Rozmieszczenie idealnie swobodne ryb zostało po raz pierwszy eksperymentalnie potwierdzone przez Milinskiego (1979). W jego akwaryjnym eksperymencie zagęszczenie cierników (*Gasterosteus aculeatus*) było wprost proporcjonalnie do koncentracji pokarmu – zwierząt planktonowych (*Daphnia magna*) w dwóch krańcach układu eksperymentalnego. Również Power (1984) zaobserwowała rozmieszczenie ryb (wąsaczy *Ancistus spinosus*) wprost proporcjonalne do obfitości pokarmu (głonów peryfitonowych) wraz z biegiem strumienia w Panamie. Ostatnio Haugen i in. (2006) potwierdzili istnienie rozmieszczenia idealnie swobodnego szczupaka (*Esox lucius*) na dużą skalę. Zaobserwowali to rozmieszczenie na podstawie czterdziestoletnich obserwacji przemieszczania się tych ryb i rozmieszczenia ich potencjalnych ofiar między – oddzielonymi od siebie przewężeniem – dwoma dużymi basenami jeziora Windermere w północno-zachodniej Anglii (patrz również Morris 2006). Natomiast Harper (1982) nie tylko zaobserwował tę zależność dla kaczek krzyżówek (*Anas platyrhynchos*) rozmieszczających się między miejscami z różną obfitością kruszyn chleba rzuconych na powierzchnię wody w stawie, ale zaobserwował również, że w każdym miejscu tej powierzchni kaczki konsumowały tę samą ilość pokarmu (każdy osobnik osiągał takie samo dostosowanie).

Choć najwięcej eksperymentów potwierdzających rozmieszczenie idealnie swobodne przeprowadzono na rybach (Schilling 2005), to wydaje się, że jeszcze bardziej wygodnymi zwierzętami do eksperymentalnego testowania tej koncepcji jest zooplankton, szczególnie wioślarki z rodzaju *Daphnia*. Jest tak, ponieważ:

**po pierwsze**, *Daphnia* szacują zasobność pokarmową środowiska wybierając takie miejsce, w którym mogą skonsumować najwięcej zasobów (Haney 1993, Plath 1998, Larsson 1997, Jensen i in. 2001 – spełnione założenie *ideal*);

**po drugie**, znikome koszty energetyczne wydatkowane na ich przemieszczanie nie wpływają istotnie na reprodukcję i tempo wzrostu (Dawidowicz i Loose 1992, Loose i Dawidowicz 1994, Dawidowicz 1998 – spełnione założenie *free*);

**po trzecie**, ich szybki cykl życiowy, rozród partenogenetyczny i możliwość synchronizacji potomstwa pozwalają na otrzymanie w krótkim czasie kohorty identycznych genetycznie osobników (spełnione założenie takich samych zdolności konkurencyjnych każdego osobnika w populacji, Lampert 2006);

**po czwarte**, ich dostosowanie można zmierzyć poprzez ocenę dobowego przyrostu masy ciała (Lampert i Trubetskova 1996);

**po piąte**, ich mobilność umożliwia szybkie ustalenie się równowagi idealnie swobodnej (Larsson 1997, Jensen i in. 2001, Lampert 2005).

Zarówno w eksperymentach laboratoryjnych z poziomym gradientem pokarmu (Jakobsen i Johnsen 1987, Larsson 1997), jak też w słupie wody w jeziorze (Jensen i in. 2001) potwierdzono istnienie rozmieszczenia idealnie swobodnego *Daphnia* w gradiencie koncentracji pokarmu (*Scenedesmus acutus*).

### 3. Dlaczego nie zawsze różnice w zagęszczeniu zwierząt odzwierciedlają różnice w obfitości zasobów?

#### 3.1. Wprowadzenie

W literaturze można znaleźć opinie, że oryginalna koncepcja rozmieszczenia idealnie swobodnego trafnie opisuje rozmieszczenie zwierząt w przestrzeni pomimo uproszczeń wynikających z jej założeń (Milinski 1984a). Potwierdza to szereg przykładów, choćby te, które zaprezentowałem powyżej. Ale są również prace, które pokazują, że różnice w zagęszczeniu populacji nie odzwierciedlają różnicy w zasobności środowiska (na ogół mniej jest zwierząt w miejscu bardziej zasobnym, a więcej w mniej bogatym w zasoby). Kennedy i Gray (1993) zestawili wnioski z 24 prac eksperymentalnych na temat rozmieszczenia idealnie swobodnego i na ich podstawie zaprezentowali cztery przyczyny, dla których zagęszczenie populacji nie zawsze odzwierciedla w pełni różnicę w zasobności środowiska. Ich argumentacje i zacytowane przez nich przykłady z literatury uzupełniłem o kolejne przykłady z prac teoretycznych oraz eksperymentalnych i prezentuję je poniżej.

### 3.2. Błędne oszacowanie różnic w zasobności środowiska

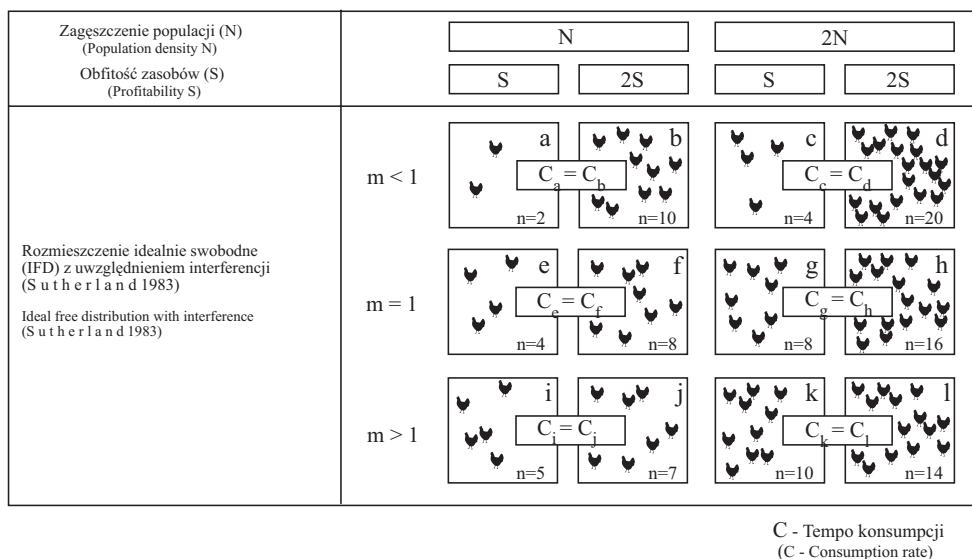
Odstępstwa od rozmieszczenia idealnie swobodnego mogą wynikać z tego, że zwierzęta pomimo swojej krótkotrwałej (Milinski i Regelman 1985) i długotrwałej (Milinski 1994, Tregenza i in. 1996b) pamięci nie potrafią precyzyjnie oszacować różnic w zasobności środowiska. Jest tak, ponieważ zmysły zwierząt nie są wystarczająco czułe i nie wszystkie miejsca w środowisku są poznane w równym stopniu (Ranta i in. 1999). Abrahams (1986) zmodyfikował oryginalną wersję modelu Fretwella i Lucasa (1970) wprowadzając do niego założenie, że zwierzęta nie mają kompletnej informacji o zasobności środowiska. Skonstruował on matematyczny model *IFD*, z którego wynika, że im różnica w zasobności środowiska jest mniejsza i im zagęszczenie konkurujących ze sobą zwierząt jest większe, tym zagęszczenie w mniejszym stopniu odzwierciedla różnice w zasobności środowiska (rys. 2B).

Kennedy i Gray (1993) wprowadzili do tego modelu dane otrzymane przez Harpera (1982) o rozmieszczeniu idealnie swobodnym kaczek (*Anas platyrhynchos*) i stwierdzili, że ich rozmieszczenie było takie jedynie wtedy, gdy różnica w obfitości pokarmu między dwoma miejscami na powierzchni stawu była większa niż „pół porcji chleba na minutę”. Poniżej tej różnicy zwierzęta rozmieszczały się równomiernie.

### 3.3. Interferencja

Koncepcja *IFD* uwzględnia jedynie konkurencję o zasoby, natomiast nic nie mówi o tym, jak konkurencja o charakterze interferencji wpływa na optymalne względem warunków pokarmowych rozmieszczenie zwierząt. Po raz pierwszy zagadnienie interferencji wprowadził do koncepcji *IFD* Sutherland (1983). Z eksperymentów wirtualnych przy użyciu jego modelu matematycznego wynika, że rozmieszczenie zależy od specyficznej dla każdego gatunku wrażliwości osobników na interferencję (parametru  $m$ , rys. 3). Według modelu Sutherlanda (1983), przy niskiej wrażliwości na interferencję, więcej zwierząt, niż przewiduje to oryginalna koncepcja *IFD* będzie przebywało w miejscu bardziej zasobnym, natomiast przy wysokiej wrażliwości na interferencję rozmieszczenie zwierząt będzie bardziej równomierne. Zwierzęta konsumować będą tyle samo pokarmu w miejscu bardziej i mniej zasobnym zarówno w niskich, jak i w wysokich zagęszczeniach populacji, przy każdej wartości parametru  $m$ . Podobne wyniki otrzymali na podstawie modelu matematycznego Tregenza (1994) oraz Tregenza i in. (1996a). Jednak prognozy ich modelu różnią się od prognoz modelu Sutherlanda (1983) tym, że wraz ze wzrostem zagęszczenia populacji i tym samym wraz z nasileniem interferencji, rozmieszczenie stawać się będzie coraz bardziej równomierne (coraz mniej odzwierciedlać będzie obfitości

zasobów). Eksperymentalnie potwierdzili to Gillis i Kramer (1987) obserwując rozmieszczenie ryb (danio przegowanego – *Brachydanania rerio*) w różnych zagęszczeniach (różna interferencja), ale ze stałą ilością pokarmu przypadającą średnio na każdą rybę w każdym wariancie eksperymentalnym. Pomimo tego, że na każdą rybę przypadała taka sama ilość pokarmu, to im zagęszczenie ryb było wyższe w wariancie eksperymentalnym, tym rozmieszczenie było bardziej równomierne. Również Baum i Kraft (1998) potwierdzili prognozy modelu matematycznego Tregenza



**Rys. 3.** Rozmieszczenie idealnie swobodne zwierząt z uwzględnieniem interferencji (Sutherland 1983), przy niskiej ( $m < 1$ ), pośredniej ( $m = 1$ ) i wysokiej ( $m > 1$ ) wrażliwości na interferencję zwierząt w populacji, w niskim (a, b, e, f, i, j) i wysokim (c, d, g, h, k, l) jej zagęszczeniu (rysunek oryginalny). Przy niskiej wrażliwości na interferencję więcej zwierząt, niż przewiduje to oryginalna koncepcja IFD przebywa w miejscu bardziej zasobnym, natomiast przy wysokiej wrażliwości na interferencję rozmieszczenie zwierząt jest bardziej równomierne. Zwierzęta konsumują tyle samo pokarmu w miejscu bardziej i mniej zasobnym zarówno w niskich, jak i w wysokich zagęszczeniach populacji, przy każdej wartości parametru  $m$

Fig. 3. An example of the ideal free distribution of an animal population according to the original IFD model in which the difference in densities is modified by the effect of interference competition  $m$  (Sutherland 1983) at low ( $m < 1$ ), medium ( $m = 1$ ), and high ( $m > 1$ ) levels of vulnerability to interference, irrespective of the population density level: low (a, b, e, f, i, j) or high (c, d, g, h, k, l) (original figure). At  $m < 1$ , the more profitable patch is relatively overused; at  $m = 1$ , the distribution is exactly as predicted by the original IFD model; and at  $m > 1$ , the more profitable patch is underused as compared to the predictions of the original IFD model. Individuals have the same consumption rate ( $C$ ) in the more and less profitable habitats, both at low and high population density levels

i in. (1996a) porównując rozmieszczenie gołębi (*Columba livia*) karmionych zielonym groszkiem w różnej dla każdego wariantu eksperymentalnego wielkości karmnikach. Im karmniki były mniejsze (silniejsze oddziaływania interferencyjne między ptakami), tym więcej zwierząt wybierało karmnik mniej zasobny. Do takich samych wniosków doszli Johnson i in. (2006) obserwując rozmieszczenie wróbli domowych (*Passer domesticus*) w różnych zagęszczeniach pokarmu (ziaren pszenicy) w różnej dla każdego wariantu eksperymentalnego wielkości karmnikach. Także Tregenza i in. (1996b) potwierdzili prognozy własnego modelu (Tregenza i in. 1996a). Przeprowadzili eksperyment, w którym wykazali, że pasożytnicze błonkówki (*Venturia canescens*) wraz ze wzrostem zagęszczenia rozmieszczały się bardziej równomiernie w środowisku między wysokim i niskim zagęszczeniem żywicieli – omacnicy spichrzanki (*Plodia interpunctella*).

### 3.4. Siła konkurencyjna osobnika

Trzecią wymienioną przez Kennedy'ego i Graya (1993) przyczyną, dla której rozmieszczenie zwierząt nie zawsze odzwierciedla rozmieszczenie zasobów, są różnice indywidualne w sile konkurencyjnej osobników. Milinski (1984b) w eksperymencie laboratoryjnym potwierdził rozmieszczenie idealnie swobodne słabszych i silniejszych konkurencyjnie cierników (*Gasterosteus aculeatus*) w gradiencie pokarmu zarówno wtedy, gdy żerowały osobno, jak i wtedy, gdy żerowały razem, pomimo ich indywidualnych różnic w sile konkurencyjnej (różnej wielkości ciała). Do innych wniosków doszli Houston i McNamara (1988) w pracy teoretycznej oraz Ens i Goss-Custard (1984) w pracy eksperymentalnej. Stwierdzili oni, że osobniki silniejsze konkurencyjnie wypierają słabsze do miejsc mniej zasobnych, a tym samym więcej zwierząt wybiera miejsca mniej zasobne, niż przewiduje to oryginalna koncepcja IFD. Wtedy rozmieszczenie zwierząt staje się despotyczne: silniejsze konkurencyjnie zwierzęta mogą osiągnąć większe dostosowanie (konsumować więcej zasobów). W takiej sytuacji rozmieszczenie nie jest zgodne z przewidywaniami oryginalnej koncepcji IFD, ponieważ nie jest spełnione założenie możliwości swobodnego przemieszczania się każdego osobnika z jednego miejsca do drugiego (*free*). Ens i Goss-Custard (1984) obserwując rozmieszczenie silniejszych i słabszych konkurencyjnie ptaków brodzących (ostrzygojadów – *Haematopus ostralegus*) wykazali, że wraz ze wzrostem zagęszczenia słabsze konkurencyjnie ptaki, za które uznali mniejsze osobniki, konsumowały mniej pokarmu, niż osobniki większe. Do podobnych wniosków doszli Berec i in. (2006). Zaobserwowali oni rozmieszczenie idealnie swobodne każdego z dwóch gatunków ryb (*Tanichthyys albonubes* i *Danio aequipinnatus*) tylko wtedy, gdy żerowały one osobno, natomiast gdy żerowały razem, jedynie rozmieszczenie *Tanichthyys*, silniejszego konkurenta było zgodne z rozmieszczeniem IFD. Natomiast *Danio* chętniej żerowały w miejscu mniej zasob-

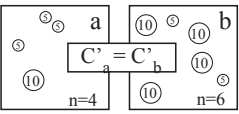
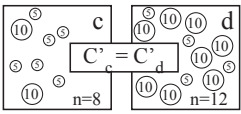


nym, niż wtedy, gdy nie było w akwarium konkurentów drugiego gatunku. Wyniki Bereca i in. (2006) dowodzą tego, że możliwość realizacji rozmieszczenia idealnie swobodnego zwierząt zależy nie tylko od różnic w sile konkurencyjnej każdego osobnika w populacji, ale również od różnic konkurencyjnych między zwierzętami populacji różnych gatunków.

Sutherland i Parker (1985) oraz Parker i Sutherland (1986) zmodyfikowali oryginalny model matematyczny *IFD* uwzględniając w nim różnice indywidualne w sile (wadze?) konkurencyjnej każdego osobnika (*competitive weight*). Na podstawie założeń swojego modelu matematycznego *IFD*, Sutherland i Parker przeprowadzili symulacje rozmieszczenia, z których wynika, że silniejsze konkurencyjnie zwierzęta chętniej niż słabsze będą wybierały miejsca bardziej zasobne i będą konsumowały tam więcej zasobów. Jednak łączna zdolność konkurencyjna wszystkich zwierząt (słabszych i silniejszych konkurencyjnie) mierzona sumaryczną ilością konsumowanego przez każde zwierzę pokarmu będzie wprost proporcjonalna do koncentracji zasobów, zarówno w miejscu mniej, jak również bardziej zasobnym. W eksperymentach wirtualnych na podstawie ich modeli matematycznych każdy osobnik o tej samej sile konkurencyjnej osiąga to samo dostosowanie (konsumuje tyle samo zasobów) zarówno w miejscu bardziej, jak i mniej zasobnym (rys. 4). Grand (1997) potwierdziła przewidywania modelowe Sutherlanda i Parkera (1985) na przykładzie łososi (*Coho salmon*). W jej eksperymentach silniejsze konkurencyjnie ryby, za które uznała nieznacznie większe osobniki, wybierały bardziej obfite w zasoby żerowiska, natomiast słabsze konkurencyjnie osobniki żerowały w miejscach mniej zasobnych. Rozmieszczenie łososi było bardziej równomierne, niż rozmieszczenie pokarmu, natomiast całkowita ilość pokarmu konsumowana przez wszystkie zwierzęta łącznie była wprost proporcjonalna do koncentracji pokarmu w każdym miejscu środowiska.

### 3.5. Przemieszczanie się zwierząt

Czwartą przyczyną odstępstw od rozmieszczenia zgodnego z oryginalną wersją koncepcji *IFD* wymienioną przez Kennedy'ego i Graya (1993) jest czas poświęcany na przemieszczanie się. W skonstruowanym przez siebie modelu matematycznym założyli, że w tym samym czasie taka sama liczba zwierząt opuszcza miejsce mniej zasobne, co miejsce bardziej zasobne w poszukiwaniu lepszego miejsca. Prowadzi to do tego, że wraz ze wzrostem czasu niezbędnego do przemieszczenia się rozmieszczenie staje się coraz mniej równomierne (proporcjonalnie coraz mniej zwierząt pozostaje w miejscu mniej zasobnym). Wnioski z symulacji na podstawie modeli matematycznych Rosenzweiga (1981), Regelmanna (1984) oraz Bernsteina i in. (1988, 1991) są odwrotne. Ich modele matematyczne przewidują, że każdy osobnik

Zagęszczenie populacji (N) (Population density N) Obfitość zasobów (S) (Profitability S)	N		2N	
	S	2S	S	2S
IFD z uwzględnieniem różnic w sile konkurencyjnej osobników (Sutherland i Parker 1985, 1992) IFD of individuals differed in competitive weights (Sutherland and Parker 1985, 1992)				

C - Tempo konsumpcji  
(C - Consumption rate)

**Rys. 4.** Rozmieszczenie idealnie swobodne zwierząt z uwzględnieniem różnic w sile konkurencyjnej osobników na podstawie modeli matematycznych Sutherlanda i Parkera (1985, 1992) w niskim (a, b) i w wysokim (c, d) zagęszczeniu populacji (rysunek oryginalny). Zwierzęta silniejsze (na przykład o większych wymiarach ciała) wypierają konkurencyjnie słabsze (mniejsze) do miejsc mniej zasobnych. Rozmieszczenie zwierząt staje się wobec tego bardziej równomierne niż przewiduje to oryginalna koncepcja IFD. Dzieje się tak zarówno w niskich, jak też w wysokich zagęszczeniach populacji. Różnice w zagęszczeniu zwierząt pomiędzy miejscem bardziej i mniej zasobnym pozostają stałe bez względu na to, jak liczebna jest cała populacja zajmująca oba te miejsca. W odróżnieniu od oryginalnego modelu IFD, jedynie zwierzęta o tej samej sile konkurencyjnej konsumują tyle samo w miejscu mniej i bardziej zasobnym

Fig. 4. An example of the ideal free distribution of an animal population according to the original IFD model in which the difference in densities is modified by the effect of superiority in resource competition (Sutherland and Parker 1985, 1992), at low (a, b) and high (c, d) population density levels (original figure). Individuals that are competitively inferior (e.g. small-bodied) are replaced by those that are competitively superior (e.g. large-bodied), and this leads to a higher proportion of large-bodied individuals in a more profitable patch. Individuals with the same competitive weight have identical consumption rates in patches of both lower and higher profitability, this being the case at both low and high population density levels. A change in population density does not change the numerical proportions between patches

z równym prawdopodobieństwem może przemieścić się do innego miejsca. Wtedy więcej zwierząt przemieszcza się z miejsca bardziej do mniej zasobnego. Powoduje to, że wraz ze wzrostem czasu niezbędnego do pokonania odległości między miejscami rozmieszczenie staje się coraz bardziej równomierne (Åström 1994).

Choć przewidywania wyżej wymienionych modeli matematycznych nie zostały potwierdzone eksperymentalnie, to niezależnie od tego, który z tych modeli lepiej przewiduje rozmieszczenie idealnie swobodne, wydaje mi się, że uwzględnienie czasu przemieszczania się zwierząt modyfikuje w mniejszym stopniu rozmieszczenie idealnie swobodne zwierząt, niż pozostałe przyczyny wymienione przez Kennedy'ego i Graya (1993) (nieumiejętność szacowania zasobności środowiska, interferencja i różna siła konkurencyjna zwierząt w populacji). Sądzę, że może być tak dlatego, że



w prowadzonych eksperymentach zwierzęta przemieszczają się na ogół na niewielkie odległości.

### 3.6. Nadmiar pokarmu

Do czterech wyżej wymienionych przyczyn, przytoczonych za Kennedym i Grayem (1993) odstępstw od rozmieszczenia idealnie swobodnego, można dodać piątą. Taką mianowicie, że rozmieszczenie zwierząt nie odzwierciedla obfitości zasobów, gdy całkowite zagęszczenie pokarmu w środowisku staje się większe niż zapotrzebowanie zwierząt. Może być tak na przykład wtedy, gdy zagęszczenie zwierząt staje się dalekie od poziomu pojemności środowiska wskutek silnej presji ze strony drapieżcy (Gliwicz 2003). Wtedy rozmieszczenie zwierząt przestaje zależeć od zagęszczenia konkurentów, ponieważ w każdym miejscu jest wystarczająco dużo zasobów, aby każdy osobnik mógł je konsumować w maksymalnym tempie. Są w literaturze prace potwierdzające takie przypuszczenie. Jakobsen i Johnsen (1987) oraz Larsson (1997) potwierdzili to dla *Daphnia pulex* w gradiencie koncentracji *Scenedesmus acutus*. W ich eksperymentach laboratoryjnych rozmieszczenie *Daphnia* było zgodne z rozmieszczeniem idealnie swobodnym jedynie wtedy, gdy koncentracja pokarmu była mniejsza od 1 mg C/l w każdym miejscu układu eksperymentalnego.

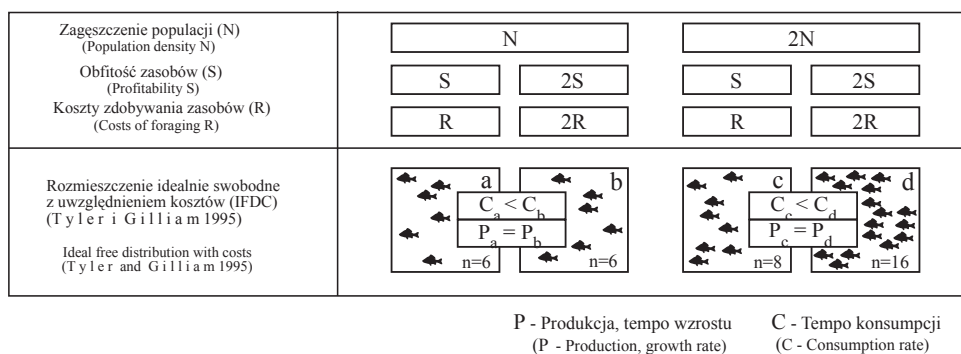
## 4. Jak zmienia się rozmieszczenie idealnie swobodne wskutek nakładów na poszukiwanie pokarmu?

W literaturze można znaleźć szereg przykładów pokazujących, że gradient natężenia dowolnego abiotycznego czynnika środowiska, niekorzystnie działającego na osobnika, może powodować zarówno redukcję tempa asymilacji, jak i wzrost respiracji. To oczywiście modyfikuje rozmieszczenie zwierząt. Może być tak wtedy, gdy zwierzęta rozmieszczają się w gradientach prędkości wiatru (Grubb i Greenwald 1982), prędkości przepływu wody (Hill i Grossman 1993, Tyler i Gilliam 1995), temperatury (Magnuson i in. 1979, Crowder i Magnuson 1983, Bergman 1987, Hughes i Grand 2000, Lampert i in. 2003) oraz zasolenia (McGaw 2001, Webster i Dill 2006).

Tyler i Gilliam (1995) jako pierwsi zmodyfikowali oryginalny model matematyczny *IFD* wprowadzając do niego założenie, że nierównomiernie rozmieszczone w środowisku koszty żerowania wywołane przez czynniki abiotyczne, redukujące asymilację i zwiększające respirację, wpływają na optymalne dla każdego osobnika rozmieszczenie zwierząt.

Model przez nich skonstruowany (*ideal free distribution with costs, IFDC*) przewiduje, że zwierzęta rozmieszczać się będą bardziej równomiernie niż przewiduje

to oryginalna koncepcja *IFD* (rys. 5). Będzie tak, ponieważ w miejscach bardziej zasobnych zwierzęta muszą ponosić większe koszty energetyczne na zdobycie tych zasobów niż w miejscach mniej zasobnych. Wraz ze wzrostem zagęszczenia populacji rozmieszczenie w coraz większym stopniu będzie odzwierciedlało obfitość pokarmu, ponieważ (1) proporcjonalnie coraz więcej zwierząt wybiera miejsca bardziej zasobne (rys. 5), a (2) koszty wynikające z konieczności radzenia sobie z niekorzystnym oddziaływaniem abiotycznego czynnika środowiska nie zależą od zagęszczenia. W przewidywaniach modelu Tylera i Gilliama dostosowanie każdego osobnika wyrażone tempem wzrostu osobnika będzie w każdym miejscu identyczne, bez względu na to, czy zagęszczenie populacji jest bliskie czy dalekie poziomowi pojemności środowiska (rys. 5).



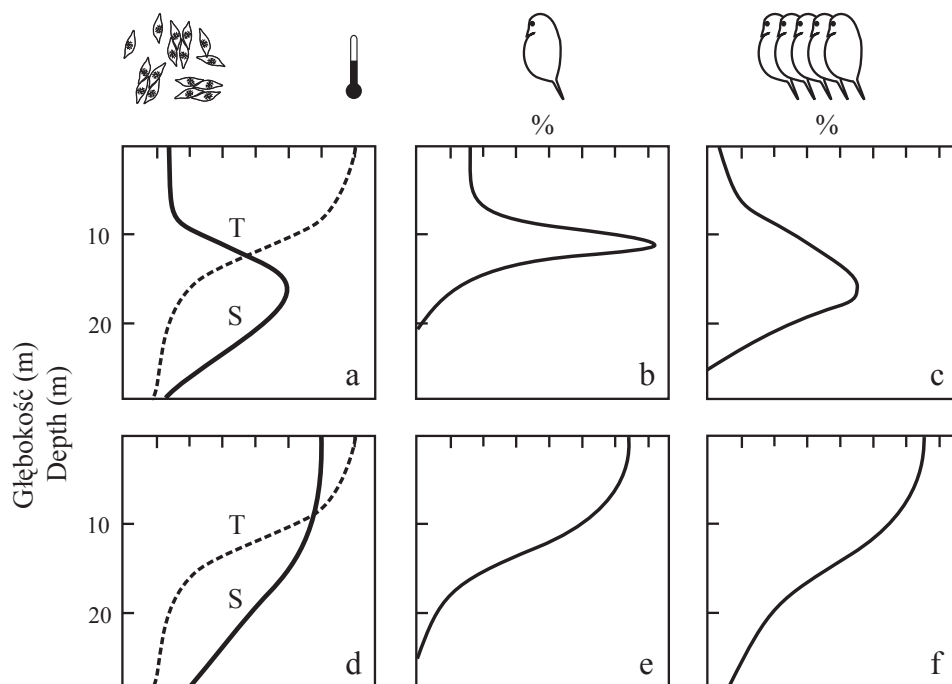
**Rys. 5.** Rozmieszczenie idealnie swobodne z uwzględnieniem kosztów zdobywania zasobów (*IFDC*, Tyler i Gilliam 1995) w niskim (a, b) i wysokim (c, d) zagęszczeniu populacji (rysunek oryginalny). Gdy koszty zdobywania zasobów są większe w miejscu bardziej zasobnym, to rozmieszczenie zwierząt staje się bardziej równomierne, niż wynikałoby z przewidywań oryginalnego modelu *IFD*. Wraz ze wzrostem zagęszczenia populacji rozmieszczenie zwierząt staje się bliższe przewidywaniom modelu oryginalnego. Miejsce bardziej zasobne jest zazwyczaj bardziej kosztowne, ale wyższy koszt zdobywania zasobów kompensowany jest tam poprzez zwiększoną rację pokarmową. Dostosowanie mierzone tempem wzrostu osobnika ( $P = A - R$ ) jest wobec tego w obu miejscach identyczne, bez względu na to, czy zagęszczenie populacji jest niskie (a, b) czy wysokie (c, d)

Fig. 5. An example of the ideal free distribution of an animal population according to the IFDC model in which the difference in densities is modified by the costs of resource sequestration (ideal free distribution with costs, IFDC, Tyler and Gilliam 1995), at low (a, b) and high (c, d) population density levels (original figure). When foraging costs are higher in a patch of greater profitability level than in a patch of lower profitability level, the distribution is more even than expected from the original IFD model. The distribution becomes closer to the predictions of the original model when population density increases. A more profitable patch is usually more „costly” due to higher foraging costs, but these additional costs are compensated by an increase in consumption rate. Fitness expressed as individual growth ( $P = A - R$ ) is therefore identical regardless of the population density level: low (a, b) or high (c, d)

Tyler i Gilliam porównali wyniki symulacji optymalnego dla każdego osobnika rozmieszczenia, powstałe na podstawie założeń swojego modelu matematycznego, z wynikami rozmieszczenia w przeprowadzonym przez nich eksperymencie, w którym badali wpływ prędkości przepływu wody, jako czynnika zwiększającego koszty energetyczne związane z pozyskiwaniem pokarmu, na rozmieszczenie idealnie swobodne ryb (*Rhinichthys atratulus*). Model matematyczny *IFDC* przez nich stworzony lepiej opisywał rozmieszczenie ryb w wodzie o nierównomiernie rozmieszczonym pokarmie i zróżnicowanym przepływie wody, niż model *IFD* nie uwzględniający kosztów (Fretwell i Lucas 1970).

Model matematyczny Tylera i Gilliana (1995) wykorzystano również do opisu pionowego rozmieszczenia zwierząt planktonowych (*Daphnia*) w gradiencie temperatury i koncentracji pokarmu (Lampert i in. 2003, Lampert 2005). Lampert i in. (2003) wykazali, że *Daphnia* przebywając w gradiencie temperatury malejącej od powierzchni w głąb oraz koncentracji pokarmu najwyższej w głębokich warstwach wody (poniżej termokliny), rozmieszczały się zgodnie z wyznaczonym na podstawie matematycznego modelu *IFDC* optymalnym dla każdego osobnika rozmieszczeniem (największe zagęszczenie w warstwie pośredniej – termoklinie, rys. 6). Jeszcze mocniejszych dowodów na to, że zwierzęta planktonowe rozmieszczały się w gradiencie temperatury i pokarmu zgodnie z modelem *IFDC* (Tyler i Gilliam 1995) dostarczył Lampert (2005). Porównał on rozmieszczenie *Daphnia* w różnych zagęszczeniach populacji. Podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach (Lampert i in. 2003), *Daphnia* gromadziły się najchętniej w termoklinie wtedy, gdy ich zagęszczenie było niskie. Gdy wzrastało, zwierzęta rozmieszczały się asymetrycznie z maksimum zagęszczenia poniżej termokliny (wody chłodnej, ale bardziej zasobnej w pokarm, rys. 6).

Prace Lamperta i in. (2003) oraz Lamperta (2005) dowodzą tego, że zwierzęta planktonowe decydując się na wybór konkretnej głębokości w gradiencie temperatury i pokarmu „uwzględniają” zagęszczenie osobników w populacji. Jednakże warunki, które wspomniani badacze stworzyli w układach eksperymentalnych, były nietypowe. Było tak, ponieważ maksimum koncentracji pokarmu znajdowało się tam w głębokiej, najchłodniejszej warstwie wody (w hypolimnionie), gdy tymczasem w typowych jeziorach najwyższa koncentracja i najlepsza jakość pokarmu znajdują się w przypowierzchniowych warstwach wody (w epilimnionie, rys. 6d). Wydaje mi się, że gdyby autorzy uwzględnili typowy gradient pokarmu, zwierzęta w ich eksperymentach rozmieszczałyby się z maksimum zagęszczenia przy powierzchni wody zarówno wtedy, kiedy zagęszczenie populacji byłoby dalekie (rys. 6e), jak też bliskie (rys. 6f) poziomowi pojemności środowiska. Badacze nie uwzględnili w swoich eksperymentach także tego, że rozmieszczenie zwierząt planktonowych w pionowym



**Rys. 6.** Optymalne rozmieszczenia pionowe *Daphnia hyalina* x *galeata* (% populacji) w słupie wody przy niskim (b, e) i wysokim (c, f) zagęszczeniu populacji na tle pionowych gradientów temperatury  $T$  i koncentracji pokarmu  $S$  (a, d) wynikające z modelu IFD uwzględniającego koszty zdobywania zasobów (IFDC, Tyler i Gilliam 1995) według symulacji potwierdzonych eksperymentalnie (plankton towers z maksimum chlorofilowym w górnym hypolimnionie) przez Lamperta (a, b, c, Lampert i in. 2003, Lampert 2005) oraz własnych oczekiwań autora dotyczących bardziej typowego gradientu koncentracji pokarmu  $S$  charakterystycznego dla większości jezior (d, e, f) (rysunek oryginalny)

Fig. 6. Optimal depth distribution of *Daphnia hyalina* x *galeata* (% of total population) in the water column at low (b, e) and high (c, f) population density levels in relation to vertical profiles (a, d) of temperature  $T$  and food concentration (satiation  $S$ ), as an outcome of the IFD model with costs (Tyler and Gilliam 1995) (original figure). Simulations were confirmed in experiments using „plankton towers” with chlorophyll hypolimnetic maxima according to Lampert (a, b, c, Lampert et al. 2003, Lampert 2005) and the author's own predictions for more typical lake habitats with the chlorophyll maximum closer to the lake surface (d, e, f)

gradientie pokarmu zależy od konieczności unikania niebezpieczeństwa ze strony drapieżników oraz ryzyka śmierci powodowanego przez drapieżniki.

## **5. Rozmieszczenie idealnie swobodne w nakładających się na siebie gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy**

### **5.1. Wprowadzenie**

Na ogół środowisko bardziej zasobne jest również bardziej niebezpieczne (Lima i Dill 1990, Holt i Lawton 1994, Hugie i Dill 1994, Gliwicz 1999, Grand i Dill 1999, Gliwicz i in. 2006b). Wobec tego jest oczywiste, że im większe niebezpieczeństwo ze strony drapieżcy, tym rozmieszczenie zwierząt w mniejszym stopniu odzwierciedla obfitość zasobów w środowisku. W pracach teoretycznych (McNamara i Houston 1990, Utne i in. 1993, Moody i in. 1996, Grand i Dill 1999, Adler i in. 2001) i eksperymentalnych (Gilliam i Fraser 1987, Abrahams i Dill 1989, Grand i Dill 1997, Heithaus i Dill 2002) pokazano, że rozmieszczenie idealnie swobodne zwierząt w populacji w nakładających się wzajemnie gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy jest bardziej równomierne, niż rozmieszczenie zwierząt tej populacji w gradientie pokarmu bez gradientu niebezpieczeństwa. Pomimo tego, że w obecności niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy rozmieszczenie zwierząt nie odzwierciedla obfitości zasobów, to rozmieszczenie ich może być idealnie swobodne (Moody i in. 1996, Grand 2002). Może być tak wtedy, gdy po ustaleniu się równowagi dynamicznej w rozmieszczeniu, dostosowanie każdego z nich będzie takie samo w każdym miejscu – będzie miało maksymalną wartość w danej koncentracji zasobów, natężeniu niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy i zagęszczenia populacji.

### **5.2. Modyfikacje rozmieszczenia idealnie swobodnego przez gradient niebezpieczeństwa, gdy zagęszczenie populacji jest dalekie lub bliskie poziomowi pojemności środowiska**

W przypadku niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy opis rozmieszczenia idealnie swobodnego komplikuje się bardziej, niż w przypadku rozpatrywania rozmieszczenia zwierząt w gradientie abiotycznych czynników środowiska. Jest tak, ponieważ niebezpieczeństwo ze strony drapieżcy zależy od zagęszczenia. Wobec tego gradient niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy może modyfikować w innym stopniu rozmieszczenie idealnie swobodne wynikające z gradientu zasobów wtedy, kiedy zagęszczenie populacji jest dalekie, niż wtedy, kiedy jest bliskie poziomowi pojemności środowiska (niskie lub wysokie lokalne zagęszczenie populacji).

Z bogatej literatury przedmiotu spodziewać się należy, że modyfikacja ta jest tym mniejsza, im większe staje się zagęszczenie populacji. Może być tak, ponieważ wraz ze wzrostem zagęszczenia zwierzęta coraz chętniej przebywają w środowisku bardziej zasobnym, gdyż w środowisku tym maleje prawdopodobieństwo śmierci *per capita* ze względu na skuteczność czuwania zwierząt w grupie (Hamilton 1971, Pulliam 1973) oraz przez efekt konfuzji (Hamilton 1971, Milinski i Heller 1978, Milinski 1984b) i rozcieńczenia (Hamilton 1971, Morgan i Godin 1985).

Potwierdzili to Rangeley i Kramer (1998) badając różnice w rozmieszczeniu ryb (czarniaków – *Pollachius virens*) straszonych makietą ptaka drapieżnego między miejscem obfitszym w zasoby (ale niebezpiecznym, przestrzeń bez roślin) oraz uboższym (ale za to bezpieczniejszym, porośniętym roślinnością – *Ascophyllum nodosum*) w różnych zagęszczeniach populacji. Gdy wybór środowiska zależał od konieczności unikania niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy i niewielkie było zagęszczenie populacji, ryby chętniej wybierały środowisko bezpieczne. Ze względu na to, że w małej grupie nie jest bezpiecznie na otwartej przestrzeni, ryby nie wychodziły z refugium do czasu, aż wzrosło zagęszczenie populacji. Gdy tak się stało, ryby – choć w ławicach, to coraz chętniej przemieszczały się do środowiska bardziej zasobnego i niebezpiecznego.

Choć nie zostało to stwierdzone ani w żadnej pracy eksperymentalnej, ani nawet w teoretycznej, wydaje mi się, że w świetle ostatnich badań nad koncepcją refugium niskiego zagęszczenia jako strategii obrony wobec drapieżników (Gliwicz i in. 2006a), modyfikacja rozmieszczenia idealnie swobodnego przez gradient niebezpieczeństwa może rzeczywiście maleć wraz ze wzrostem zagęszczenia, ale jedynie w zagęszczeniach bliskich poziomowi pojemności środowiska (Gliwicz i in. 2006a). Natomiast w niskich zagęszczeniach modyfikacja ta w rzeczywistości również może maleć, ale przy zmniejszaniu się zagęszczenia ofiary, ponieważ drapieżca przestaje się stopniowo interesować swą dotychczasową ofiarą, gdy jej zagęszczenie jest na tyle małe, że korzyści energetyczne z jej upolowania są mniejsze, niż sumaryczne wydatki energetyczne na jej odnalezienie, schwytanie i konsumpcję (Gliwicz i Wrzosek 2008).

Wobec tego spodziewam się, że modyfikacja rozmieszczenia idealnie swobodnego w gradiencie pokarmu przez gradient niebezpieczeństwa będzie najmniejsza w najniższych i najwyższych zagęszczeniach populacji. To znaczy będzie tak albo ze względu na dostępność refugium niskiego zagęszczenia Gliwicza i in. (2006a), albo ze względu na efekty rozcieńczenia, „wielu par oczu” i konfuzji Hamiltona (1971). Natomiast obecność gradientu niebezpieczeństwa najbardziej modyfikować będzie rozmieszczenie zgodne z *IFD* względem samego gradientu pokarmu w pośrednich zagęszczeniach.

Rangeley i Kramer (1998) opisali jeden z nielicznych eksperymentów, w których testowano modyfikacje rozmieszczenia idealnie swobodnego ryb w gradiencie pokarmu przez gradient niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy. W pracy tej jednak jest to wątek poboczny. Dyskutowane jest w niej jedynie rozmieszczenie zwierząt, bez porównywania dostosowania zwierząt wybierających różne miejsca w środowisku.

### 5.3. Dostosowanie zwierząt w gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy

W gradiencie pokarmu i gradiencie natężenia dowolnego abiotycznego czynnika środowiska niekorzystnie działającego na osobnika można zmierzyć dostosowanie poprzez obliczenie indywidualnego tempa wzrostu. Natomiast w nakładających się wzajemnie gradientach pokarmu i ryzyka śmierci ze strony drapieżcy należy uwzględnić również ryzyko śmierci powodowane przez drapieżniki (Werner i Gilliam 1984, Gilliam i Fraser 1987).

Moody i in. (1996) założyli w swoim modelu matematycznym, że każde zwierzę w stanie równowagi *IFD* w nakładających się na siebie gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa osiąga ten sam sukces reprodukcyjny mierzony wartością reprodukcyjną. W założeniach ich modelu wartość ta zależy zarówno od wydatków energetycznych wynikających z konieczności unikania niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy, jak też od ryzyka śmierci powodowanego przez drapieżniki. Werner i Gilliam (1984) zaproponowali inny sposób porównania dostosowania zwierząt wybierających różne miejsca w środowisku w gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa. W symulacjach rozmieszczenia zwierząt powstałych na podstawie ich matematycznego modelu optymalnie rozmieszczające się zwierzęta chętniej wykorzystują zasoby w miejscu bardziej obfitym w pokarm do czasu, gdy iloraz ryzyka śmierci do indywidualnego tempa wzrostu w środowisku bardziej i mniej zasobnym wyrówna się. Dla większości zwierząt trudniej jest zmierzyć tempo wzrostu, niż tempo ich konsumpcji (ale patrz Lampert 2006). Biorąc to pod uwagę Gilliam i Fraser (1987) wykorzystali w swoim modelu matematycznym inną, łatwiejszą, choć mniej dokładną miarę dostosowania. Mianowicie, wykorzystali do tego iloraz ryzyka śmierci i tempa konsumpcji pokarmu.

Niestety, dla większości zwierząt trudno jest zmierzyć dostosowanie osobników wybierających różne miejsca w środowisku w przenikających się gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy, ponieważ trudno jest wyznaczyć indywidualne tempo wzrostu i ryzyko śmierci oraz trudno odnaleźć wspólną jednostkę w porównaniu obu komponentów dostosowania (indywidualnego tempa wzrostu i ryzyka śmierci). Wobec tego w literaturze znaleźć można prace, w których autorzy



zamiast porównywać dostosowanie zwierząt wybierających różne miejsca w środowisku, opisują modyfikacje rozmieszczenia idealnie swobodnego przez obecność niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy za pomocą energetycznego ekwiwalentu ryzyka (Abrahams i Dill 1989, Kotler i Blaustein 1995, Grand i Dill 1997, 1999, Abramsky i in. 2002, Brown i Kotler 2004, Riley i Dill 2005).

#### 5.4. Energetyczny ekwiwalent ryzyka

Abrahams i Dill (1989) wykorzystali koncepcję Fretwella i Lucasa (1970), a Grand i Dill (1997) koncepcję IFD z uwzględnieniem różnic indywidualnych (Sutherland i Parker 1985, Parker i Sutherland 1986) do udowodnienia, że niebezpieczeństwo ze strony drapieżcy może być mierzone w jednostkach energii. Wyznaczyli oni ilość pokarmu, która musi być wprowadzona do miejsca niebezpiecznego, aby zwierzęta rozmieściły się tak, jakby nie było tego niebezpieczeństwa. Abrahams i Dill (1989) wykazali istnienie rozmieszczenia idealnie swobodnego gupików (*Poecilia reticulata*) między bardziej i mniej zasobnym środowiskiem w nieobecności zagrożenia ze strony drapieżników. Następnie wprowadzili do miejsca bardziej zasobnego w pokarm informację o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy (makieta ptaka drapieżnego). Porównali zmiany rozmieszczenia ryb w obecności i nieobecności tego sygnału. Następnie dodali tyle pokarmu do miejsca bardziej niebezpiecznego, ile trzeba było dodać, aby rozmieszczenie ryb powróciło do tego obserwowanego przed wprowadzeniem do układu eksperymentalnego informacji o niebezpieczeństwie. Tym sposobem zmierzili ilość pokarmu będącą ekwiwalentem ryzyka. Wyżej wymienieni autorzy zasugerowali w swoich pracach, że nie tylko konsumpcję zasobów, ale również niebezpieczeństwo ze strony drapieżcy można wyrazić w jednostkach energii. W swoich eksperymentach założyli liniową zależność między ryzykiem śmierci a wzrostem zagęszczenia populacji. Jednak w świetle przewidywań modelu Moody'ego i in. (1996) wydaje się, że zależność ta może mieć inną postać, o czym wspomniałem powyżej. Wydaje się wobec tego, że energetyczny ekwiwalent ryzyka może być różny wtedy, gdy zagęszczenie populacji jest bliskie poziomowi pojemności środowiska lub od tego poziomu dalekie (Moody i in. 1996, Houston i in. 1998).

Energetyczny ekwiwalent ryzyka można zastosować do ilościowego oszacowania wpływu informacji o niebezpieczeństwie ze strony drapieżcy na rozmieszczenie idealnie swobodne zwierząt. Jego zastosowanie jednak nie może dać odpowiedzi na pytanie, czy dostosowanie każdego osobnika w stanie równowagi idealnie swobodnej w gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy jest takie samo w każdym miejscu środowiska. Taką odpowiedź dałoby natomiast zmierzenie dostosowania osobnika w każdym odmiennym pod względem zasobów i nie-



bezpieczeństwa miejscu środowiska. O ile takie wirtualne eksperymenty zostały już przeprowadzone (Moody i in. 1996, Giske i in. 1997 – **rys. 7**), o tyle prawdziwie eksperymentalnej próby na ten temat do tej pory nie przeprowadzono. Wydaje się rzeczą dziwną, że nikt do tej pory tego nie zrobił. Sądzę, że najłatwiej taką próbę poprowadzić by można było na zwierzętach planktonowych.

## 6. Podsumowanie

Choć testowanie koncepcji *IFD* cieszyło się największym zainteresowaniem ekologów behawioralnych przed dwudziestu laty, to jednak do tej pory koncepcja ta wzbudza zainteresowanie. Świadczy o tym bogata literatura przedmiotu z ostatnich lat, z której w tym artykule udało mi się omówić 28 pozycji (publikacje od 2000 roku). Literatura ta dotyczy przede wszystkim wykorzystania koncepcji *IFD* w opisie optymalnego dla każdego osobnika rozmieszczenia w gradientach obfitości zasobów i natężenia cech środowiska odpowiedzialnych za spowalnianie tempa wzrostu i rozrodu.

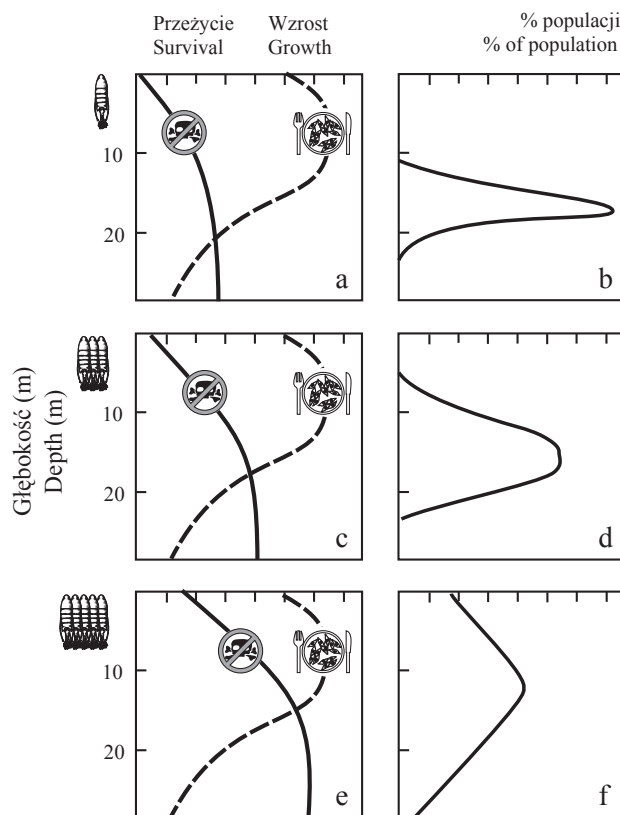
O ile wiele uwagi poświęcono eksperymentalnemu testowaniu modyfikacji *IFD* przez gradient kosztów wynikających z oddziaływania gradientu czynników abiotycznych (temperatury, zasolenia, prędkości przepływu wody, prędkości wiatru), to ze znacznie mniejszym zainteresowaniem spotkała się możliwość testowania modyfikacji rozmieszczenia idealnie swobodnego przez gradient niebezpieczeństwa ze strony drapieżcy. Ostatnio ukazały się wyniki prób ilościowego oszacowania tej modyfikacji za pomocą energetycznego ekwiwalentu ryzyka. W żadnej z tych prób nie sprawdzono jednak, czy taka modyfikacja prowadzi do takiego rozmieszczenia osobników, przy którym dostosowanie każdego osobnika wynikające z lokalnej obfitości pokarmu i zagrożenia ze strony drapieżcy staje się identyczne w każdym miejscu środowiska.

Wydaje się, że taki test najłatwiej byłoby przeprowadzić na roślinożernych zwierzętach planktonowych takich jak *Daphnia*. Zwierzęta te bowiem:

**po pierwsze**, lepiej niż dla innych zwierząt spełniają wszystkie założenia oryginalnej koncepcji *IFD* (o czym pisałem w rozdziale 2);

**po drugie**, zamieszkują wody otwarte, gdzie potrzeba uwzględnienia zagęszczenia populacji w wyborze optymalnego miejsca w gradientach pokarmu i niebezpieczeństwa jest bardziej oczywista niż gdzie indziej;

**po trzecie**, reagują nie tylko na fizyczną obecność drapieżcy wywołującego śmiertelność zwierząt eksperymentalnych, ale również na obecność chemicznej informacji o jego obecności, dzięki czemu nie ubywa zwierząt podczas trwania eksperymentu;



**Rys. 7.** Optymalne rozmieszczenia pionowe widłonoga (% populacji) w słupie wody przy niskim (b), pośrednim (d) i wysokim (f) zagęszczeniu populacji na tle pionowych gradientów wyliczonego tempa wzrostu (linia przerywana) i prawdopodobieństwa przeżycia (linia ciągła) wynikające z modelu *IFD* zastosowanego przez Giske i in. (1997) dla widłonogów planktonowych z uwzględnieniem niebezpieczeństwa ze strony ryby planktonożernej jako drapieżcy (rysunek oryginalny). Założyli oni, że niebezpieczeństwo to maleje (1) wraz ze wzrostem głębokości (ofiara coraz mniej widoczna dla drapieżnika) oraz (2) wraz ze wzrostem zagęszczenia populacji (efekt rozcieńczenia). Założyli również, że ograniczająca rola zasobów pokarmowych jest taka sama, jak w oryginalnym modelu *IFD*

Fig. 7. Optimal depth distribution of a herbivorous copepod (% of total population) in the water column at low (b), intermediate (d) and high (f) population density levels in relation to vertical profiles of individual growth rate (dashed lines) and survival probability (continuous lines) resulting from the *IFD* model applied by Giske et al. (1997) (original figure). These authors assumed that the effect of food limitation is the same as in the original *IFD* model. They also assumed that the risk of predation by planktivorous fish declines (1) from the surface down to the deepwater refuge (prey more visible in higher light intensity), and (2) from low to high copepod population density levels (due to the dilution effect)

**po czwarte**, wykazują szereg cech, dzięki którym łatwiej niż u innych zwierząt można zmierzyć dostosowanie osobnika (za pomocą pomiaru tempa produkcji potomstwa lub ilorazu ryzyka śmierci i tempa wzrostu), cechy te to np. szybki przyrost masy ciała, możliwość otrzymania w krótkim czasie tysięcy identycznych genetycznie, równowiekowych osobników.

Sądzę, że właśnie zwierzęta planktonowe stać się mogą znakomitym modelem dla testowania teorii przedstawionych w tym artykule. Próby przetestowania na takich zwierzętach modyfikacji oryginalnej koncepcji *IFD* przez gradient niebezpieczeństwa znane mi są jedynie z jednej pracy (Giske i in. 1997). Jednak jest to praca czysto teoretyczna. Wobec tego wyniki ich eksperymentów wirtualnych wymagają potwierdzenia w eksperymentach rzeczywistych. Spodziewam się, że właśnie w tym kierunku rozwinąć się mogą w najbliższej przyszłości badania nad rozmieszczeniem idealnie swobodnym zwierząt.

**Podziękowania:** Dziękuję prof. Maciejowi Gliwiczowi za krytyczne komentarze do wcześniejszych wersji tego artykułu, mgr Annie Hankiewicz i mgr. Piotrowi Mrówce za korektę językową tekstu, a mgr Ewie Rutkowskiej za pomoc w przygotowaniu rysunków. Chciałbym również podziękować prof. Januszowi Uchmańskiemu i dwóm anonimowym recenzentom, którzy nanieśli bardzo szczegółowe poprawki do pierwszej wersji komputeropisu.

## 7. Piśmiennictwo

- Abrahams M.V. 1986 – Patch choice under perceptual constraints: a cause for departures from the IFD – *Behav. Ecol. Sociobiol.* 10: 409–415.
- Abrahams M.V. 1989 – Foraging guppies and the ideal free distribution: The influence of information on patch choice – *Ethology*, 82: 116–126.
- Abrahams M.V., Dill L.M. 1989 – A determination of the energetic equivalence of the risk of predation – *Ecology*, 70: 999–1007.
- Abramsky Z., Rosenzweig M.L., Subach A. 2002 – The costs of apprehensive foraging – *Ecology*, 83: 1330–1340.
- Adler F.R., de Roos A., Richards S. 2001 – Patterns of patch rejection in size structured populations: Beyond the ideal free distribution and size segregation – *Evol. Ecol. Res.* 3: 805–827.
- Astrom M. 1994 – Travel cost and the ideal free distribution – *Oikos*, 69: 516–519.
- Baum W.M., Kraft J.R. 1998 – Group choice: competition, travel, and the ideal free distribution – *J. Exp. Anal. Behav.* 69: 227–245.

- Berec M., Krivan V., Berec L. 2006 – Asymmetric competition, body size, and foraging tactics: testing the ideal free distribution in two competing fish species – *Evol. Ecol. Res.* 8: 929–942.
- Bergman E. 1987 – Temperature-dependent differences in foraging ability of two percids, *Perca fluviatilis* and *Gymnocephalus cernuus* – *Environ. Biol. Fishes*, 19: 45–53.
- Bernstein C., Kacelnik A., Krebs J.R. 1988 – Individual decisions and the distribution of predators in a patchy environment – *J. Anim. Ecol.* 57: 1007–1026.
- Bernstein C., Kacelnik A., Krebs J.R. 1991 – Individual decisions and the distribution of predators in a patchy environment II: The influence of travel costs and structure of the environment – *J. Anim. Ecol.* 60: 205–226.
- Blanckenhorn W.U., Morf C., Reuter M. 2000 – Are dung flies ideal-free distributed at their mating and oviposition sites? – *Behaviour*, 137: 233–245.
- Brown J.B., Kotler B.P. 2004 – Hazardous duty pay and the foraging cost of predation – *Ecol. Lett.* 7: 999–1014.
- Cressman R., Krivan V., Garay J. 2004 – Ideal free distributions, evolutionary games, and population dynamics in multiple-species environments – *Am. Nat.* 164: 473–489.
- Crowder L.B., Magnuson J.J. 1983 – Cost-benefit analysis of temperature and food resource use: A synthesis with examples from the fishes (W: Behavioral energetics. Red. W.P. Aspey, S.I. Lustick) – Ohio State University Press, Columbus, 189–221.
- Croy M., Hughes R.N. 1991 – Effects of food supply, hunger, danger and competition on choice of foraging location by the fifteen-spined stickleback, *Spinachia spinachia* L. – *Anim. Behav.* 42: 131–139.
- Davies N.B., Halliday T.R. 1979 – Competitive mate searching in male common toads *Bufo bufo* – *Anim. Behav.* 27: 1253–1267.
- Dawidowicz P. 1998 – Koszty behawioralnej obrony przed drapieżnictwem: model dobowych migracji zwierząt planktonowych – *Wiad. Ekol.* 45: 3–16.
- Dawidowicz P., Loose C.J. 1992 – Costs of swimming by *Daphnia* during diel vertical migration – *Limnol. Oceanogr.* 37: 665–669.
- Dill L.M. 1987 – Animal decision making and its ecological consequences: the future of aquatic ecology and behaviour – *Can. J. Zool.* 65: 803–811.
- Ens B.J., Goss-Custard J.D. 1984 – Interference among oystercatchers, *Haematopus ostralegus*, feeding on mussels, *Mytilus edulis*, on the Exe estuary – *J. Anim. Ecol.* 53: 217–231.
- Fretwell S.D. 1972 – Populations in seasonal environments – Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Fretwell S.D., Lucas H.L. 1970 – On territorial behavior and other factors influencing habitat distribution in birds. I. Theoretical development – *Acta Biotheor.* 19: 16–36.

- Gilliam J.F., Fraser D.F. 1987 – Habitat selection under predation hazard: test of a model with stream-dwelling minnows – *Ecology*, 68: 1856–1862.
- Gillis D.M., Kramer D.L. 1987 – Ideal interference distributions: population density and patch use by zebrafish – *Anim. Behav.* 35: 1875–1882.
- Giske J., Rosland R., Berntsen J., Fiksen Ø. 1997 – Ideal free distribution of copepods under predation risk – *Ecol. Modell.* 95: 45–59.
- Gliwicz Z.M. 1999 – Pomiędzy perspektywą głodu a zagrożeniem ze strony drapieżcy: Ekologia zwierzęcia wód otwartych – *Kosmos*, 48: 405–424.
- Gliwicz Z.M. 2003 – Between hazards of starvation and risk of predation: the ecology of offshore animals – *Excellence in Ecology 12*, International Ecology Institute, Oldendorf/Luhe, Germany.
- Gliwicz Z.M., Dawidowicz P., Maszczyk P. 2006a – Low-density anti-predation refuge in *Daphnia* and *Chaoborus*? – *Arch. Hydrobiol.* 167: 101–114.
- Gliwicz Z.M., Slon J., Szynekarczyk I. 2006b – Trading safety for food: evidence from gut contents in roach and bleak captured at different distances offshore from their daytime littoral refuge – *Freshwater Biol.* 51: 823–839.
- Gliwicz Z.M., Wrzosek D. 2008 – Predation-mediated coexistence of large- and small-bodied *Daphnia* at different food levels – *Am. Nat.* 0: 00–00.
- Godin J., Keenleyside M.H.A. 1984 – Foraging on patchily distributed prey by a cichlid fish (*Teleostei: Cichlidae*): a test of the ideal free distribution theory – *Anim. Behav.* 32: 120–131.
- Gotceitas V., Colgan P. 1991 – Assessment of patch profitability and ideal free distribution: The significance of sampling – *Behaviour*, 119: 65–76.
- Grand T.C. 1997 – Foraging site selection in juvenile coho salmon: Ideal free distributions of unequal competitors – *Anim. Behav.* 53: 185–196.
- Grand T.C. 2002 – Foraging-predation risk trade-offs, habitat selection, and the coexistence of competitors – *Am. Nat.* 159: 106–112.
- Grand T.C., Dill L.M. 1997 – The energetic equivalence of cover to juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): ideal free distribution theory applied – *Behav. Ecol.* 8: 437–447.
- Grand T.C., Dill L.M. 1999 – Predation risk, unequal competitors and the ideal free distribution – *Evol. Ecol. Res.* 1: 389–409.
- Grubb T.C., Greenwald L. 1982 – Sparrows and a brush-pile: foraging responses to different combinations of predation risk and energy cost – *Anim. Behav.* 30: 637–640.
- Hamilton W.D. 1971 – Geometry for the selfish herd – *J. Theor. Biol.* 31: 295–311.
- Haney J.F. 1993 – Environmental control of diel vertical migration behaviour – *Adv. Limnol.* 39: 1–17.
- Harper D.C. 1982 – Competitive foraging in mallards: ‘ideal free’ ducks – *Anim. Behav.* 30: 575–584.

- Haugen T.O., Winfield I.J., Vøllestad L.A., Fletcher J.M., James J.B., Stenseth N.C. 2006 – The ideal free pike: 50 years of fitness-maximizing dispersal in Windermere – *Proc. Biol. Sci.* 273: 2917–2924.
- Heithaus M.R., Dill L.M. 2002 – Food availability and tiger shark. Predation risk influence bottlenose dolphin habitat use – *Ecology*, 83: 480–491.
- Hill J., Grossman G.H. 1993 – An energetic model of microhabitat use for rainbow trout and rosyside dace – *Ecology*, 74: 685–698.
- Holt R.D., Lawton J.H. 1994 – The ecological consequences of shared natural enemies – *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 495–520.
- Houston A.I., McNamara J.M. 1988 – A framework for the functional analysis of behaviour – *Behav. Brain Sci.* 11: 117–163.
- Houston A.I., McNamara J.M., Moody A.L. 1998 – A critical analysis of the titration procedure introduced by Abrahams and Dill (1989) – *Behav. Ecol. Sociobiol.* 44: 143–146.
- Hughes N.F., Grand T.C. 2000 – Physiological ecology meets the ideal free distribution: predicting the distribution of size-structured fish populations across temperature gradients – *Environ. Biol. Fishes*, 59: 285–298.
- Hugie D.M., Dill L.M. 1994 – Fish and game: a game theoretic approach to habitat selection by predators and prey – *J. Fish Biol.* 45 (Suppl. A): 151–169.
- Jakobsen P.J., Johnsen G.H. 1987 – Behavioural response of the water flea *Daphnia pulex* to a gradient in food concentration – *Anim. Behav.* 35: 1891–1895.
- Jensen K.H., Larsson P., Högstedt G. 2001 – Detecting food search in *Daphnia* in the field – *Limnol. Oceanogr.* 46: 1013–1020.
- Johnson Ch.A., Giraldeau L.A., Grant J.W.A. 2006 – Intensity of interference affects the distribution of house sparrows, *Passer domesticus*, at food patches – *Anim. Behav.* 71: 965–970.
- Kacelnik A., Krebs J.R., Bernstein C. 1992 – The ideal free distribution and predator-prey populations – *Trends Ecol. Evol.* 7: 50–55.
- Kennedy M., Gray R.D. 1993 – Can ecological theory predict the distribution of foraging animals? A critical analysis of experiments on the ideal free distribution – *Oikos*, 68: 158–166.
- Kotler B.P., Blaustein L. 1995 – Titrating food and safety in a heterogeneous environment: when are the risky and safe patches of equal value – *Oikos*, 74: 251–258.
- Krebs J.R., Davies N.B. 2001 – Wprowadzenie do ekologii behawioralnej – Wyd. Naukowe PWN, Warszawa.
- Lampert W. 2005 – Vertical distribution of zooplankton: density dependence and evidence for an ideal free distribution with costs – *BMC Biology*, 3: 1–10.
- Lampert W. 2006 – *Daphnia*: model herbivore, predator and prey – *Pol. J. Ecol.* 54: 607–620.

- Lampert W., McCauley E., Manly B. 2003 – Trade-offs in the vertical distribution of zooplankton: ideal free distribution with costs? – *Proc. R. Soc. Lond. B*, 270: 765–773.
- Lampert W., Sommer U. 1997 – *Limnoecology – the ecology of lakes and streams* – Oxford University Press, New York.
- Lampert W., Trubetskova I. 1996 – Juvenile growth rate as a measure of fitness in *Daphnia* – *Funct. Ecol.* 10: 631–635.
- Larsson P. 1997 – Ideal free distribution in *Daphnia*? Are daphnids able to consider both the food patch quality and the position of competitors? – *Hydrobiologia*, 360: 143–152.
- Lima S.L., Dill L.M. 1990 – Behavioural decisions made under the risk of predation: a review and prospectus – *Can. J. Zool.* 68: 619–640.
- Loose C.J., Dawidowicz P. 1994 – Trade-offs in diel vertical migration by zooplankton: the costs of predator avoidance – *Ecology*, 75: 2255–2263.
- Magnuson J.J., Crowder L.B., Medvick P.A. 1979 – Temperature as an ecological resource – *Am. Zool.* 19: 331–343.
- McGaw I.J. 2001 – Impacts of habitat complexity on physiology: purple shore crabs tolerate osmotic stress for shelter – *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 53: 865–876.
- McNamara J.M., Houston A.I. 1990 – State-dependent ideal free distributions – *Evol. Ecol.* 4: 298–311.
- Milinski M. 1979 – An evolutionary stable feeding strategy in sticklebacks – *Z. Tierpsychol.* 51: 36–40.
- Milinski M. 1984a – Competitive resources sharing: an experimental test of a learning rule for ESSs – *Anim. Behav.* 32: 233–242.
- Milinski M. 1984b – A predator's costs of overcoming the confusion effect of swarming prey – *Anim. Behav.* 32: 1157–1162.
- Milinski M. 1994 – Long-term memory for food patches and implications for ideal free distributions in sticklebacks – *Ecology*, 75: 1150–1156.
- Milinski M., Heller R. 1978 – Influence of a predator on the optimal foraging behaviour of stickleback – *Nature*, 275: 642–644.
- Milinski M., Parker G.A. 1991 – Competition for resources (W: Behavioural ecology. Red. J.R. Krebs, N.B. Davies) – Blackwell Sci. Publ. Oxford, 137–168.
- Milinski M., Regelman K. 1985 – Fading short-term memory for patch quality in sticklebacks – *Anim. Behav.* 33: 678–680.
- Moody A.L., Houston A.I., McNamara J.M. 1996 – Ideal free distributions under predation risk – *Behav. Ecol. Sociobiol.* 38: 131–143.
- Morgan J., Godin J.G. 1985 – Antipredator benefits of schooling behaviour in a cyprinodontid fish, the banded killifish (*Fundulus diaphanus*) – *Z. Tierpsychol.* 70: 236–246.
- Morris D.W. 2006 – Moving to the ideal free home – *Nature*, 443: 645–646.

- Parker G.A. 1984 – Evolutionarily stable strategies (W: Behavioural ecology: An evolutionary approach. Red. J.R. Krebs, N.B. Davies) – Sunderland, MA: Sinauer, 30–61.
- Parker G.A., Sutherland W.J. 1986 – Ideal free distributions when individuals differ in competitive ability: phenotype-limited ideal free models – *Anim. Behav.* 70: 1222–1242.
- Plath K. 1998 – Adaptive feeding behavior of *Daphnia magna* in response to short-term starvation – *Limnol. Oceanogr.* 43: 593–599.
- Power M.E. 1984 – Habitat quality and the distribution of algae-grazing catfish in a Panamanian stream – *J. Anim. Ecol.* 53: 357–374.
- Pulliam H.R. 1973 – On the advantages of flocking – *J. Theor. Biol.* 38: 419–422.
- Rangeley R.W., Kramer D.L. 1998 – Density-dependent antipredation tactics and habitat selection in juvenile pollock – *Ecology*, 79: 943–952.
- Ranta E., Lundberg P., Kaitala V. 1999 – Resource matching with limited knowledge – *Oikos*, 86: 383–385.
- Regelmann K. 1984 – Competitive resource sharing: a simulation model – *Anim. Behav.* 32: 226–232.
- Riley C.A., Dill L.M. 2005 – The Little Miss Muffet effect: quantifying the effect of predation risk on foraging patch choice by houseflies (*Musca domestica*) – *J. Insect Behav.* 18: 847–857.
- Rosenzweig M.L. 1981 – A theory of habitat selection – *Ecology*, 62: 327–335.
- Schilling N.S. 2005 – Survival of the fittest: Fish in patchy environments show ideal free distribution (IFD) – *Eukaryon*, 1: 11–16.
- Stephens D.W., Krebs J.R. 1986 – Foraging theory – Princeton Monographs in Behavior and Ecology 4, Princeton University Press.
- Sutherland W.J. 1983 – Aggregation and the „ideal free” distribution – *J. Anim. Ecol.* 52: 821–828.
- Sutherland W.J. 1996 – From individual behaviour to population ecology – Oxford University Press.
- Sutherland W.J., Parker G.A. 1985 – Distribution of unequal competitors (W: Behavioral ecology. Red. R.M. Sibly, R.H. Smith) – Blackwell Scientific Publications, Oxford, 255–273.
- Sutherland W.J., Parker G.A. 1992 – The relationship between continuous input and interference models of ideal free distributions with unequal competitors – *Anim. Behav.* 44: 345–355.
- Tregenza T. 1994 – Common misconceptions in applying the ideal free distribution – *Anim. Behav.* 47: 485–487.
- Tregenza T. 1995 – Building on the ideal free distribution – *Adv. Ecol. Res.* 26: 253–307.
- Tregenza T., Parker G.A., Thompson D.J. 1996a – Interference and the ideal free distribution: models and tests – *Behav. Ecol.* 7: 379–386.
- Tregenza T., Thompson D.J., Parker G.A. 1996b – Interference and the ideal free distribution: Oviposition in a parasitoid wasp – *Behav. Ecol.* 7: 387–394.



- Tyler J.A., Gilliam J.F. 1995 – Ideal free distributions of stream fish: a model and test with minnows, *Rhinichthys atratulus* – Ecology, 76: 580–592.
- Utne A.C.W., Aksnes D.L., Giske J. 1993 – Food, predation risk and shelter: an experimental study on the distribution of adult two-spotted goby *Gobiusculus flavescens* (Fabricius) – J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 166: 203–216.
- Veeranagoudar D.K., Shanbhag B.A., Saidapur S.K. 2004 – Foraging behaviour in tadpoles of the bronze frog *Rana temporalis*: Experimental evidence for the ideal free distribution – J. Biosc. 29: 201–207.
- Webster S.J. 2006 – Using behaviour as a tool to estimate the costs of abiotic conditions for juvenile salmon – Rozprawa Doktorska na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Simona Fräsera, Kanada.
- Webster S.J., Dill L.M. 2006 – The energetic equivalence of changing salinity and temperature to juvenile salmon – Funct. Ecol. 20: 621–629.
- Werner E.E., Gilliam J.F. 1984 – The ontogenetic niche and species interactions in size-structured populations – Annu. Rev. Ecol. Syst. 15: 393–426.

## 8. Summary

The model of ideal free distribution (IFD, Fretwell and Lucas 1970, Fretwell 1972) can predict the optimal distribution of individuals of a given animal population between patches of different resource profitability. The two most important assumptions of the IFD model are that (1) each individual is able to assess the level of resources and chose the most proficient location which offers the highest possible fitness gain, and (2) each individual is free to move from one patch to another with no costs involved in its relocation. The IFD model predicts that the density of an animal population reflects resource profitability: the higher the resource levels (resource productivity), the higher the population density (Figs. 1 and 2a). While early examples demonstrated the great predictive value of the IFD model, more recent studies have shown that the model is too robust to accurately reflect animal distribution. Considerable empirical data have shown that there are consistent deviations from the IFD, and that densities in proficient sites are often lower than expected from the outcome of this model, and vice versa.

The original imperfect IFD model (Fig. 2a) has therefore been gradually replaced by various modifications, including those that consider the inability to correctly assess the resource profitability level (Fig. 2b), the effect of competitive interference (Fig. 3), differences in superiority in resource competition (Fig. 4), and other factors such as travel costs. However, the aforementioned modifications are not as important for individual fitness as the separate components of individual growth  $P$ , either by reduced assimilation  $A$  or elevated respiration  $R$  ( $P = A - R$ ).

While the energetic costs of resource sequestration have been readily incorporated into the IFD model (Figs. 5 and 6), energy expenditure for antipredation defenses has been ignored until it was revealed that the numbers of animals having to choose between a safe but less profitable, and a risky but more profitable patch, overmatched in the former and under-matched in the latter situation. This phenomenon, revealed in a virtual population (Fig. 7), appears suited to an experimental study involving the major components of individual fitness underlying the final equilibrium state of a population's distribution over a range of food profitability and predation risk.

(wpłynął: 22 grudnia 2007 r.)

## **VI.2. Załącznik 2**

Maszczyk P., Babkiewicz E., Czarnocka-Cieciura M., Gliwicz Z.M. and Uchmański J. W przygotowaniu – Interference Ideal Free Distribution with costs of *Daphnia* in the gradient of resources and the gradient of risk to predation by planktivorous fish.

# Interference Ideal Free Distribution with costs of *Daphnia* in the gradient of resources and the gradient of risk to predation by planktivorous fish

Piotr Maszczyk<sup>1\*</sup>, Ewa Babkiewicz<sup>1</sup>, Marta Czarnocka-Cieciura<sup>1</sup>, Z. Maciej Gliwicz<sup>1</sup> and Janusz Uchmański<sup>2</sup>

**Running head:** Trade-off in growth and survival

<sup>1</sup>Department of Hydrobiology, University of Warsaw, Banacha 2, 02-097 Warsaw, Poland

\*e-mail: [fizbanek@wp.pl](mailto:fizbanek@wp.pl)

<sup>2</sup>Cardinal Stefan Wyszyński University in Warsaw, Dewajtis 5, 01-815 Warszawa, Poland

## Abstract

Each animal should select a place to live where the combination of ambient conditions offers the highest fitness gain. In case of planktonic animals such as *Daphnia*, vertical distribution of individuals of a population should be the effect of optimizing decisions taken by each individual. Our aim was to test this hypothesis in the gradient of resources alone, and in a combination of overlapping gradients of resources (food concentration) and risk to visual predation (high light intensity combined with fish kairomones) when each individual (juvenile or adult), should optimize its decisions by trading-off high growth rate for low mortality risk both would be different at a different population density level. This hypothesis has been tested by comparing (in the same ambient conditions) the theoretical distributions from simulations based on an experimentally-parameterized, optimizing individual based model (in consistence with assumptions of IIFD) with the distributions observed in laboratory experiment performed in a new experimental system with twin vertical columns allowing creation of stable, repeatable, and independent gradients of temperature, food concentration and light intensity, each reflecting qualitatively ambient conditions. Depth distributions of *Daphnia* in the experimental system were found to mimic theoretical distributions, thus confirming the IIFD hypothesis. The distribution in food gradient alone reflected the distribution of resources, but the results were closer to those which include the perceptual constraints of individuals rather than to those that assume their omniscience. The analysis of depth selection of single individuals indicated that, despite preferring the depth providing the highest fitness, each individual would sooner or later move away into the upwards or downward stratum, this being either due to imperfect senses and bad memory, but also reflecting the unpredictability of the environmental changes. The modification due to the effect of predation-risk gradient was stronger at higher *Daphnia* densities and in adults than juveniles. Results were closer to the theoretical distributions in both gradients than in food gradient alone, which may indicate that the mortality risk is a stronger force of natural selection, or that the gradient of light illuminations carries more reliable information on the mortality risks than food gradient on the potential growth rate.

### **VI.3. Załącznik 3**

Maszczyk P. 2016 – Miniature plankton columns to study the depth distribution of zooplankton at gradients of food, predation risk, temperature, and UV radiation – *Limnology and Oceanography Methods* 14: 210–223.

## Miniature plankton columns to study the depth distribution of zooplankton at gradients of food, predation risk, temperature, and UV radiation

Piotr Maszczyk\*

Department of Hydrobiology, Faculty of Biology at Biological and Chemical Research Center, Al. Żwirki i Wigury 101, University of Warsaw, 02-089 Warsaw, Poland

### Abstract

The aim of this study is to describe a novel and comprehensive small-scale experimental system consisting of twin vertical columns used to study the depth selection of planktonic animals. The system allows simultaneous observations to be made of changes in depth distribution at individual and population levels with minimized constraints restricting the movements of an individual, compared to earlier efforts with other miniaturized experimental systems. It also secures constant and reproducible vertical gradients of temperature, visible light, UV radiation, algal concentrations, and light intensity and spectrum in the visible range. This system mimics a natural combination of field conditions, albeit at a diminished scale, with each gradient independently of the others. The research capability of the system is demonstrated by the preliminary results of a simple experiment in which the depth distribution of a group of *Daphnia* and the depth selection by a single *Daphnia* in each of the four gradients was recorded.

Many field and experimental studies have tested habitat selection in planktonic animals in lakes and oceans, particularly in the context of diel vertical migrations, with a focus on either proximate (Ringelberg 1999; Cohen and Forward 2009) or ultimate consequences (De Meester et al. 1998). Although in their early phase, studies on depth selection by zooplankton were based on simple field sampling followed by the qualitative evaluation of preserved samples (Hutchinson 1967), recent studies have shifted toward a field experimental approach including whole-lake or enclosure experiments (Lampert 2011). These approaches, however, suffer from the limitations caused by low replicability, restricted experimental control, inaccurate experimental design (likely due to the fact that climatic conditions cannot be controlled), and by the inability to examine the effect of a single factor by excluding all other factors (Hurlbert 1984). In recent decades, indoor experimental setups with well controlled conditions have been commonly incorporated into experimental tests. An ideal experimental system of “plankton columns” would need to fulfill three general conditions: (1) it would have to allow both the observation of a process of depth selection by a single individual, and that of changing depth distribution by a population or a group of conspecifics; (2) it would have to minimize the detrimental effects resulting from different constraints due to the arti-

ciality and reduced scale of experimental conditions, particularly in the horizontal plane, and; (3) it should allow for stable and replicable gradients that can be independent of each other, each quantitatively or qualitatively reflecting the ambient conditions of a typical field situation. Literature on the subject does not appear to provide even a single example of an experimental design that would fulfill all three of these conditions.

The first condition could be fulfilled using an appropriately sized tube as an experimental setup. Its height and volume should be small enough to allow scrupulous observations of an individual animal directly by eye or by an IR camera with a night vision device, but at the same time should be sufficiently large enough to permit the study of the change in depth distribution at low population density levels. Unfortunately, this cannot be secured by small laboratory systems such as “plankton organs” (e.g., Dawidowicz and Loose 1992; Gliwicz et al. 2012). Conversely, large, indoor experimental setups (Price 1989; Lampert and Loose 1992) do allow observations to be made of changes in the depth distribution of a population (e.g., De Meester et al. 1995; Lampert and Grey 2003), but do not permit the tracking of single individuals.

The second condition, also difficult to fulfill, is the elimination of numerous artifacts of laboratory conditions, particularly from the miniaturization of the experimental system, as well as from their horizontal space orientation (Englund

\*Correspondence: p.maszczyk@uw.edu.pl

and Cooper 2003). Miniaturization of the system increases the contact of experimental animals with the unnatural surfaces of walls, and also may restrict their movements and consequently influence their depth selection (Lampert and Loose, 1992; Dodson et al. 1997; Ringelberg 1999). Moreover, according to Ringelberg (1999), it is possible to compress the conditions occurring in a water column in nature into a few centimeters, but compressing the movements of experimental animals causes them to experience excessively rapid changes in the gradients of ambient conditions (Harris and Wolfe 1956). The horizontal space orientation of an apparatus could also cause constraints due to the reluctance of planktonic animals to move in that plane. Although the construction of experimental setups in a horizontal plane has some advantages, especially the possibility to create a persistent gradient of food (algal) concentration, they also require some sophisticated modifications that limit the scope of the study of zooplankton habitat selection, e.g.,: (1) an application of a ring-shaped experimental system allowing movement of individuals in both directions (Cuddington and McCauley 1994; Larsson 1997; Schatz and McCauley 2007), (2) the use of planktonic animals originating from fishless pools and shallow lakes that are relatively mobile in the horizontal plane (*Daphnia pulex* in Cuddington and McCauley 1994; Neary et al. 1994; Larsson 1997; *Daphnia magna* in Roozen and Lürling 2001 and Schatz and McCauley 2007), and (3) the miniaturization of the experimental setup (e.g., Neary et al. 1994; Van Gool and Ringelberg 1996; Roozen and Lürling 2001).

The third condition needed in a comprehensive experimental design to study depth selection behavior of zooplankton is the possibility to create different overlapping gradients, particularly the five most important gradients determining depth selection in natural environments: thermal stratification, the profile of intensity and light-spectrum gradient (as a main component of the visual gradient of information on predation risk), the UV radiation profile, the depth distribution of phytoplankton food, and the gradient of chemicals (e.g., kairomones, alarm substances, toxins). Each of the five gradients should fulfill a variety of requirements depending on the questions asked by the research. In particular, it should reflect (quantitatively or qualitatively) the ambient conditions of the water column in the field. It should also be stable, reproducible, and independent of other gradients and the density of experimental animals in the experimental setup. Usually, the simplest setups allow the creation of just one gradient that only quantitatively reflects ambient conditions, such as food concentration (Van Gool and Ringelberg 1996; Larsson 1997), concentration of chemicals released by predators and competitors (Roozen and Lürling 2001), temperature (Grossart et al. 2010), or light intensity (Gutierrez et al. 2011). More complex setups, such as the system of transparent acrylic used by Rhode et al. (2001) allows a qualitative representation of the thermocline and UV radiation, and a quanti-

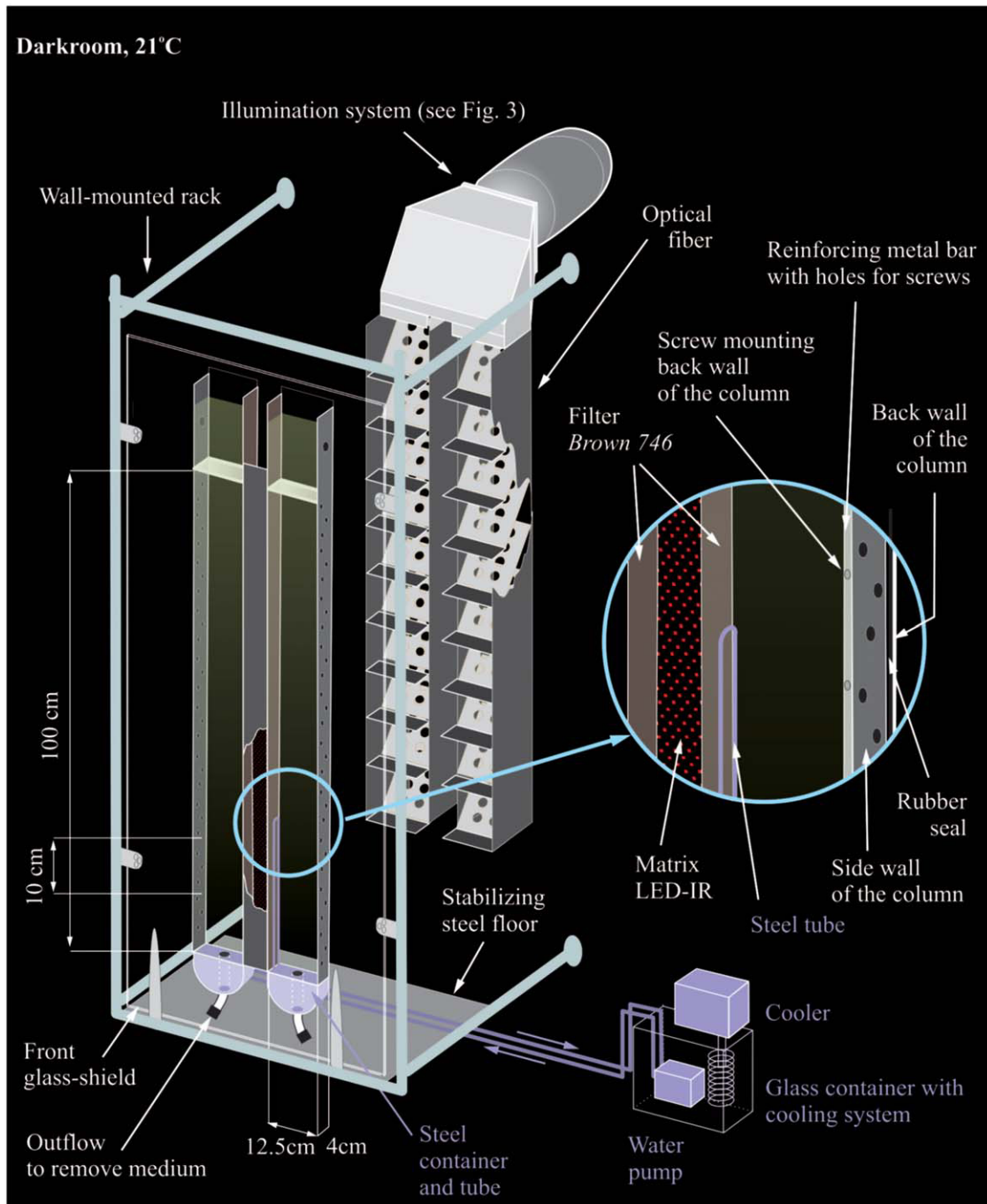
tative representation of the gradient of the intensity of visible light. Regardless of its size, each experimental system should also ensure the repeatability of observations in subsequent replications in space and time performed in identical gradients persisting throughout each experiment in spite of the effects of different zooplankton densities and distractions by sampling. Hence, the necessity to create reproducible conditions demands a compromise in the size of the experimental system. Although the majority of small experimental systems allows repetitions in space and facilitates rapid temporal repetitions, they are not capable of taking samples without affecting both the thermal and algal gradients, nor able to prevent the movement of planktonic animals. On the contrary, large systems offer the possibility of “harmless” sampling, but some of them do not allow replication in space (Balch et al. 1978; Lampert and Loose, 1992). The need to establish reproducible conditions applies not only to repetitions of the same treatment, but also to repetitions in different treatments. The latter can be fulfilled only when an additional condition is satisfied: that each of the gradients is created independently of the gradients of other factors (e.g., in population density, thermal stratification), thus permitting the assessment of which factors are either synergistic or additive to each other in their effects on depth selection by zooplankton. This condition is particularly difficult to achieve for the gradient of algal concentration. Although the literature provides many setups that would allow the creation of a gradient of algae (e.g., Lampert and Loose 1992; Neary et al. 1994; Larsson 1997; Bukovinszky et al. 2013), none of them allow the creation of a gradient with its maximum in the epilimnion, which could qualitatively reflect ambient conditions, and be independent of the viscosity gradient caused by thermal stratification.

The aim of this study is to describe a novel, small-scale experimental system to study depth selection of planktonic animals that fulfills each of the three aforementioned conditions by (1) allowing the simultaneous observation of changes in depth distribution of a group of individuals and in the depth selected by an individual, (2) allowing observations with minimized (relatively to other miniaturized systems) artificial constraints restricting the movement of an individual, and (3) securing stable and reproducible vertical gradients of temperature, algal concentration, UV radiation and light (intensity and spectrum), each reflecting natural field conditions, albeit in a reduced spatial scale, each independent of the other. The system was tested with a series of simple experiments in which the change in depth distribution of a group of *Daphnia* and depth selection by a single *Daphnia* were examined separately in each of the four gradients.

## Material and procedures

### The basic construction

The apparatus, located in a temperature-controlled dark room, consists of twin vertical columns 120 cm high with



**Fig. 1.** Basic construction of the twin small-scale vertical plankton columns: dimensions, stabilizing elements of the setup, the connection between the front and back sides of a column, location of LED-IR matrix and filter of visible light (*Brown 746*, *LEE filters*) allowing observation in the dark (shown in the enlarged circular frame), as well as the construction of the cooling system to create a stable (in the course of the experiment), repeatable (between the columns and repetitions through time) temperature gradient typical for summer stratification (in purple).

an inside volume of 5 L ( $100 \times 12.5 \times 4$  cm of internal height, length, and width), each divided into 10, 10-cm-high sections (each with a volume of 0.5 L) in which planktonic animals can freely move (Fig. 1). Each column is composed of two parts (back and front), connected by a seal and

screwed (screws are fixed to two aluminum reinforcements attached along each column) so that each of them can be easily opened and cleaned, or modified inside. The back part is made of a transparent acrylic wall (0.6 cm thick), with an optical fiber attached from behind (Fig. 1). The inner side



wall is transparent and the outer is black, both made of 0.6 cm thick acrylic. The front wall ( $120 \times 20.5 \times 0.6$  cm) is constructed with double-quartz glass and is wider (4 cm) than the required width (12.5 cm) on both sides to protect against breakage. It is connected to the stainless steel floor by two brackets, increasing the contact surface with the tabletop to improve the stability of the system, which is further enhanced by fastening the columns to the laboratory wall using a steel frame. Swift enumeration of the animals ranging in size from 0.3 mm (juvenile *Daphnia*) to  $>10$  mm (*Artemia franciscana* or juvenile *Meganyctiphanes norvegica*) at subsequent depths is possible using a night vision device held by the observer. This is efficient due to: (1) the flat front walls of highly transparent scratch-resistant quartz-glass; and, (2) the installation of a near IR LED matrix of 200 lights (designed and constructed specifically for this system) in the space between the two columns. These lights, with wavelengths of 840–850 nm, are invisible to *Daphnia* and emit limited heat (COM-09469, <https://www.sparkfun.com/products/9469>). The light from the IR matrix passes through the inner side wall of each column and through the filter glued to the wall (LEE Filters, <http://www.leefilters.com, Brown 746>), which is transparent in IR, but not in visible light. The infrared light laterally illuminates the interior side of the column and highlights each individual which appears as a bright spot on the dark background. The light does not blind the camera or the observer.

#### Temperature gradient

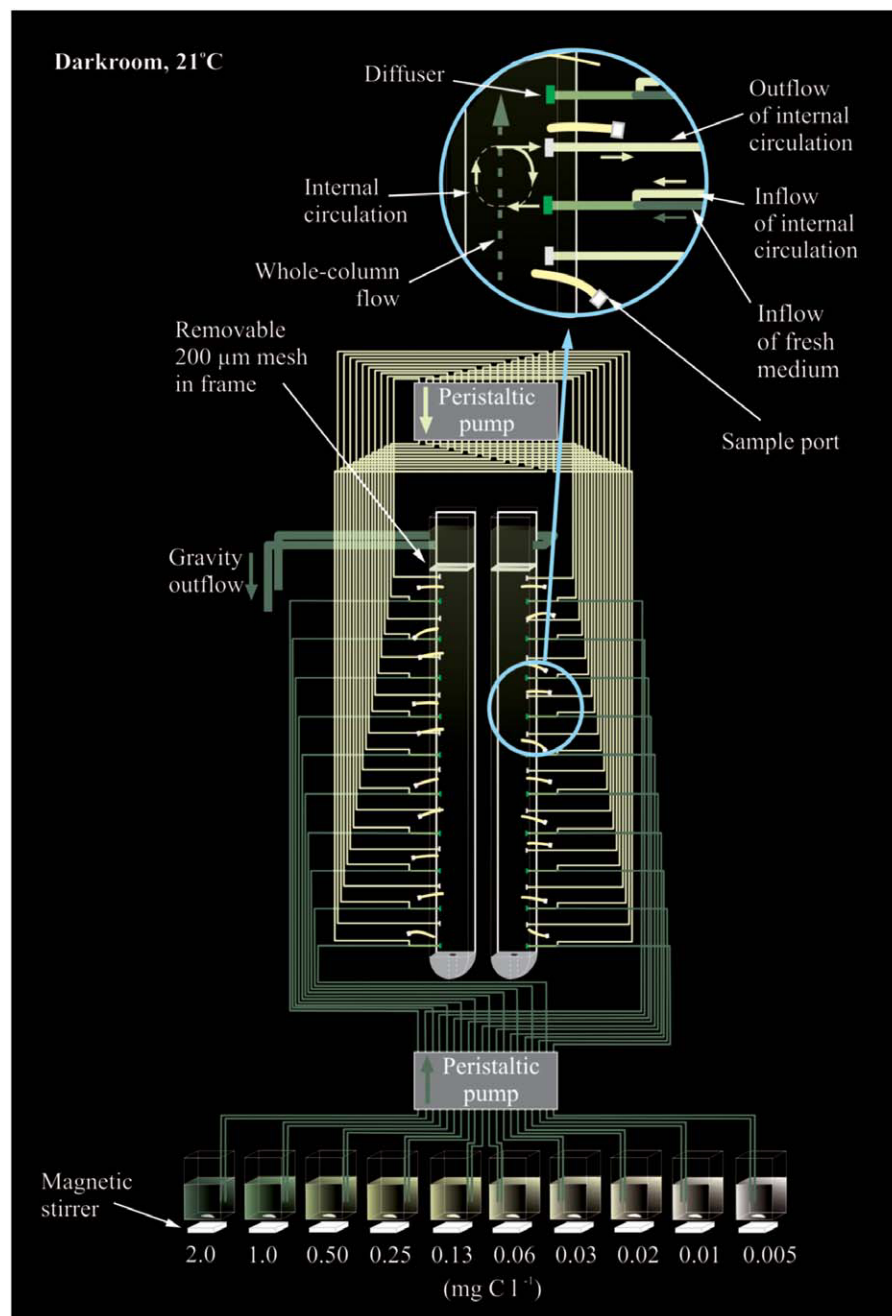
The temperature gradient is created by pumping distilled water through plastic tubes in a closed loop between the cooling system that consists of a cooler in a glass container filled with distilled water, and steel containers located at the bottom of each column connected with 0.6-cm diameter steel tubes passing close to the inner wall through the bottom four sectors of each column (Fig. 1). The steepness of the gradient can be regulated between 8°C and 21°C at the bottom and top using different settings of the cooler and the flow of the water pump, as well as the air temperature of the dark room. Although temperatures higher than 21°C at the top can be obtained simply by increasing the temperature in the laboratory room, a temperature lower than 8°C at the bottom can be obtained only with an additional (or more effective) cooling system. The temperature of each section can be measured from the top of the column using a miniaturized waterproof electronic thermometer with a sensor at the end of a cable.

#### Gradient of food concentration

The persistent gradient of phytoplankton food could be generally achieved using flow-through, done by fixing inflows of media containing filtered lake water with different concentrations of algae at subsequent depths. The typical algae gradient (maximum concentration at the top of each column) is produced by: (1) a slow flow-through of medium

from the bottom to the top of each column created by inflows with different concentrations of algae at subsequent depths (one inflow assigned to each sector), and a gravity outflow at the top of each column, with a flow of  $90 \text{ mL} \times \text{h}^{-1}$  driven by a peristaltic pump, as well as (2) the flow of the internal circulation of the medium within each sector of the column produced by one inflow and one outflow assigned to each sector, with a flow of  $180 \text{ mL} \times \text{h}^{-1}$  driven by a second peristaltic pump (Fig. 2). Due to the presence of the flow-through of medium from the bottom to the top of each column, the rate of medium exchange differed in subsequent sectors, being the lowest in the bottom and the highest in the top sector (0.18 and 1.80 times per hour, respectively). Both inflows assigned to each sector from the two flow-throughs are connected with each other before they enter the column, creating one collective inflow with a flow of  $270 \text{ mL} \times \text{h}^{-1}$  of the mixed medium (one per each sector, 20 for both columns). Each collective inflow is terminated by a round (20 mm diameter) and flat (2 mm thickness) diffuser, adjacent to the side wall of the column, which moderates the strength of the water stream. Each outflow of internal circulation (20 for both columns) also begins with a similar diffuser, which mitigates the strength of the suction of the medium flowing out from the sector (Fig. 2). The flow driven by both pumps is sufficiently weak to allow the existence of a thermal gradient, and not to affect the depth selection of an individual, but is strong enough to establish an algae gradient that is identical (in the two columns), stable (within each experiment), repeatable (between experiments), and independent from other gradients. Preliminary tests performed during the construction process of the apparatus showed that it can be used not only for small-celled *Chlamydomonas reinhardtii* that can actively maintain its position in a water column using its flagella, and the larger-celled more sedentary *Scenedesmus obliquus*, but also for large strand cyanobacteria such as *Cylindrospermopsis raciborskii*. The system also allows an atypical shape of gradient to be created (e.g., with a deep chlorophyll maximum) by the inflows of media with the higher concentration of algae in the middle sectors.

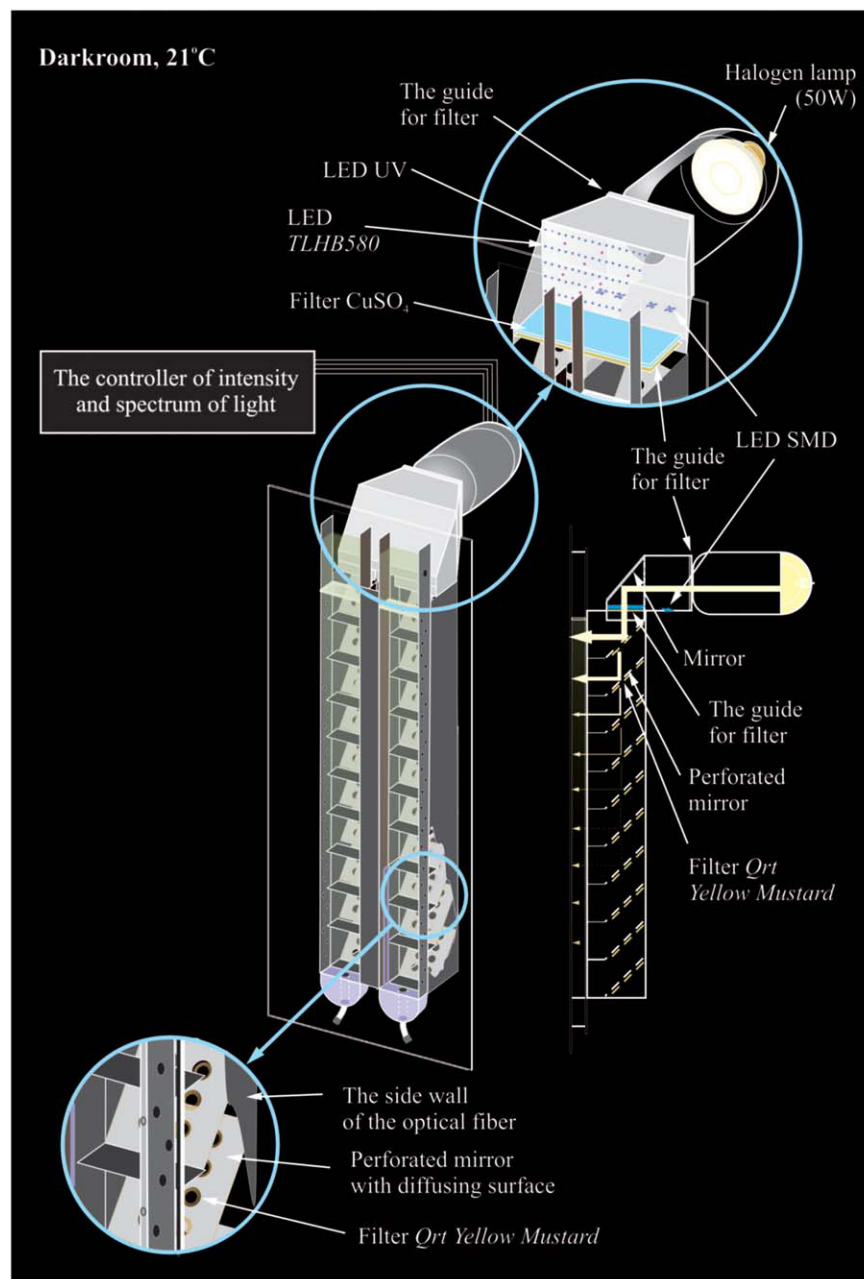
Fresh media with lake water and different food concentrations enter the subsequent sectors of the columns from 6 L glass containers where they are constantly mixed by magnetic stirrers to prevent the sedimentation of algae, and supplied into each system every 8 h. One sampling port is located in the middle of each sector. Additional sampling ports are located at the bottom of the lowest sector and at the top of the upper sector. The concentration of organic carbon in each sample taken from subsequent depths is assessed by the measurement of chlorophyll concentration using a fluorometer (TD-700 Fluorometer, Turner Designs, Sunnyvale, California, U.S.A.) and the conversion of the results to carbon concentration is done according to the calibration curve calculated separately for each type of algae.



**Fig. 2.** General construction of the system enabling experiments to be performed in both columns with a gradient of algal concentration that is stable, repeatable, independent of the viscosity gradient caused by thermal stratification, and has a typical maximum in the epilimnion. It is produced by: (1) a flow-through of medium from the bottom to the top of each column, created by inflows of media containing filtered lake water with different concentrations of algae at subsequent depths (one inflow assigned to each sector), and a gravity outflow at the top of each column, as well as (2) a slow-flow internal circulation of medium within each sector of the column, produced by one inflow and one outflow assigned to each sector, and respectively, started and ended with a diffuser (shown in the enlarged circular frame). Each of the flow-throughs is driven by a peristaltic pump. Sampling ports allow the gradient to be measured and a removable 200  $\mu\text{m}$  mesh in a frame is placed at the top of the upper sector to prevent animals from reaching the gravity outflow.

After the introduction of experimental animals at the beginning of each experiment (using a funnel and tube), a removable 200- $\mu\text{m}$  mesh-size net in frame is placed at the top of the upper sector to prevent animals from swimming into the

gravity outflow. During the introduction of animals, the funnel and the top part of the tube is above the column's water surface, thus creating pressure that could force the animals out.



**Fig. 3.** Another view of the system showing its internal construction which enables the simulation (in a scale), in each of the two columns, of the spatial and temporal changes of light intensity and spectrum in the UV-A and visible range from 340 nm to 880 nm of any field scenario. It consists of: (1) the light sources and filters in the two nontransparent containers (shown in the enlarged upper circular frame), which produce a horizontally oriented initial light beam, (2) the mirror that changes the direction of the beam (from vertical to horizontal), and (3) the optical fiber that is symmetrically refracted diagonally into two fibers, which are located along the back side of each column. Each of the fibers contains perforated mirrors with filters that divide the beam so that it partially enters the column and partially passes through the mirror into the next section of the fiber. Temporal changes of light are possible using a programmable controller that can change the light intensity of each of the four light sources independently.

### Light intensity and spectrum

A gradient of light intensity is created using a system of different light sources and vertical optical fibers (Fig. 3), and monitored using a portable LI-COR (LI-189, Lincoln,

Nebraska, U.S.A.) photometer. The main light source (50 W halogen lamp) is placed in a nontransparent container oriented horizontally, which is connected to a second nontransparent container (with two additional LED light

sources, as well as a system composed of light filters) containing a glass mirror inclined at an angle of  $45^\circ$ . The combined beam of light from all sources is reflected by the mirror and enters vertically into one optical fiber that is symmetrically refracted diagonally into two fibers located along the back side of each column. Each part of the twin fibers corresponding to subsequent sectors of the column contains an oblique mirror made of rigid diffusing aluminum foil perforated with evenly cut holes. The light that enters each part of the fiber is partially refracted on the diffusing surface of the mirror and enters the sector horizontally. The light that passes through the holes in the mirror enters the next part of the fiber. Light conditions at subsequent depths can be simply adjusted to any field scenario in a lake (or sea), reflecting them in a given scale by changing the size of the holes in each mirror. The containers with the light sources are oriented horizontally due to the limited vertical space in the laboratory room. Their horizontal orientation and the need to use a mirror to change the direction of the light beam to a vertical orientation results in a relatively low light intensity near the surface of the water in the top sector (up to  $12 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), which produces a light intensity more similar to that near the surface at sunset rather than at noon. Preliminary tests performed during the construction of the apparatus revealed that if space allowed, using a vertically-oriented container would permit a much higher initial light intensity (up to  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) using the same light sources. Producing a light intensity similar to that present close to the lake surface during a sunny day ( $> 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) would require a higher wattage light source in combination with a cooling ventilator.

A gradient of light spectrum that resembles (in a smaller scale) that of a given field situation can be achieved by introducing an initial light spectrum to the top of the twin optical fibers (as well as to the top sector of each column), and then modifying it as it enters the subsequent parts of the fibers (and subsequent sectors). Any variation of the initial light spectrum in the range of visible light (400–780 nm) can be obtained using a combination of the three light sources and optical filters placed in the two opaque containers of the light system (Fig. 3), with the spectrum at each depth assessed using a UV-VIS spectrophotometer (*USB2000*, *Ocean Optics*, Dunedin, Florida, U.S.A.). The spectrum created by the halogen lamp placed in the first container of the optical system (Fig. 3) can be supplemented with two additional blue LED light sources composed of two types of diode arrangements: first, 66 *TLHB580* diodes (<http://www.digchip.com>) distributed uniformly on a thin transparent acrylic plate through the whole cross-section of the second container, and second, 4 *SMD Helixeon star Royal Blue* diodes (Helipto, Hungary) placed uniformly on the floor of the second container (Fig. 3). The beam emitted by these light sources can be shaped by optical filters, either foil filters (e.g., *LEE filters*, <http://www.leefilters.com>) to change the

spectrum into the visible range, or an aqueous  $\text{CuSO}_4$  solution to remove the IR portion and also to reduce excess visible light in the 600–780 nm range that is emitted by the halogen lamp. The aqueous solution is injected through a silicone plug into the quartz-glass container that covers the whole cross-section of the connection between the second container and the optical fiber ( $11 \times 15 \times 105$  cm, width, length, and height). For example, to simulate at a scale of 1 : 15 (1 sector of each column reflects conditions from 1.5 m of the water column in the lake) the sunlight spectrum at a depth of 0.75 m in the water column of a typical eutrophic Lake Roś (Great Mazurian Lakes, Poland), the system would be configured with: (1) an initial light spectrum that enters the top sector from the halogen lamp; (2) passes through a perforated (46% of the surface covered with evenly distributed 0.4 cm holes) foil filter *Qrt Yellow Mustard* (*LEE filters* 643, <http://www.leefilters.com>), which transmits wavelengths mostly between 520 nm and 580 nm, and finally; (3) through a filter of  $\text{CuSO}_4$  solution (8% by weight). The light spectrum in subsequent sectors can be modified, creating a gradient that resembles (in a scale) that of a given scenario from a lake or an ocean, by the addition of a perforated filter under each mirror containing holes smaller than its perforation (Fig. 3). This results in the whole beam of light passing through the holes in the mirror also partially passing through the filter, which modifies its spectrum. For instance, to simulate the gradient that resembles the gradient in Lake Roś, 19% of the holes in each part of the fibers should be covered by an *Qrt Yellow Mustard* filter (*LEE filters* 643, <http://www.leefilters.com>). The gradient from any other eutrophic lake can be similarly mimicked simply by modifying the  $\text{CuSO}_4$  solution and the perforation percentage of the *Qrt Yellow Mustard* filter. Reflection of the gradient in the ocean or in the clearest oligotrophic lakes requires the addition of the light spectrum from blue LEDs in a range of between 400 nm and 500 nm. All three light sources are connected to the optical driver (single-chip microcontroller ATmega88, Atmel, San Jose, California, U.S.A., Fig. 3) by a control panel (Terminal serial port emulation program) on the computer, which allows smooth changes in both the intensity and spectrum of light in the diurnal cycle using an independent adjustment of the voltage of each of the three visible light sources.

Although the light that enters the columns is not polarized because neither a typical LED, nor halogen light source emits polarized light, it is easy to create a polarization regime in the apparatus through the installation of a foil polarization filter (e.g., <http://www.vidimensio.eu/catalog/>) on the path of the light beam that enters each of the two optical fibers. The only limitation of this approach is that polarized filters significantly reduce the intensity of the light passing through. Therefore, such an approach requires the application of stronger light sources in the apparatus.



### UV gradient

The gradient of UV-A radiation is created by placing 10 LED diodes (FoxUV™, <http://www.aptechnologies.co.uk>, with max peak at 353 nm), distributed uniformly on a transparent acrylic plate, through the whole cross-section of the second container, and by adding perforated (covered with 30% evenly distributed holes) filters (226 LEE U.V., LEE Filters, <http://www.leefilters.com>) under each mirror in the fibers that absorb the light in the UV range, but is transparent for the light in the visible range. UV light, before entering the fibers, passes through a quartz glass filter with an aqueous CuSO<sub>4</sub> solution that is transparent for UV (opposed to typical sodium glass). The intensity of UV light can be assessed using a UV-VIS spectrophotometer (USB2000, Ocean Optics, Dunedin, Florida, U.S.A.) and regulated in a diurnal cycle automatically using the same optical driver that is used to regulate the intensity and spectrum of other light sources.

### The assessment

#### Experimental design

All experiments conducted to examine the temporal change in the depth distribution of a *Daphnia* population and the process of depth selection by a single *Daphnia* individual were performed in each of the four gradients separately in the experimental apparatus placed in a darkroom at 21°C. The shape of each gradient was determined (by trial and error) in tests preceding the first preliminary experiment. The gradients of algae as a food (Fig. 4b), temperature (Fig. 4c), light intensity (Fig. 4e), and spectrum in the visible range (Fig. 4f), were created in an attempt to imitate field conditions in the water column during a cloudy afternoon (19:30 h) in Lake Roś in September 2008 at a scale of 1 : 15 (0.1 m of height of a sector corresponded to 1.5 m of the water column in the lake). Due to the fact that UV light intensities in the lowland Lake Roś were near the level of detection, even near the surface, a gradient was created (Fig. 4d) to reflect the conditions in another lake, the oligotrophic Czarny Staw, on a sunny day in August 2008.

All 48 experiments were performed in the two columns of the experimental apparatus, each lasting 8 h. There were (1) four preliminary experiments to check the effect of flow-through on *Daphnia* distribution; (2) three experiments with *Daphnia* densities of 40 L<sup>-1</sup> in each of the four gradients—algal, temperature, light in the visible range and UV radiation (3 × 4 = 12), and; (3) eight experiments on the depth selection of a single individual in each of the four gradients (8 × 4 = 32). All four preliminary experiments were performed without flow-through during the first 4 h and with flow during the last 4 h. In the final experiments, *Daphnia* depth distribution was observed in the absence of the four gradients (but with the presence of flow-through) during the first 4 h and in one of the gradients during the last 4 h. Each gradient (either food, temperature, visible range light, or UV

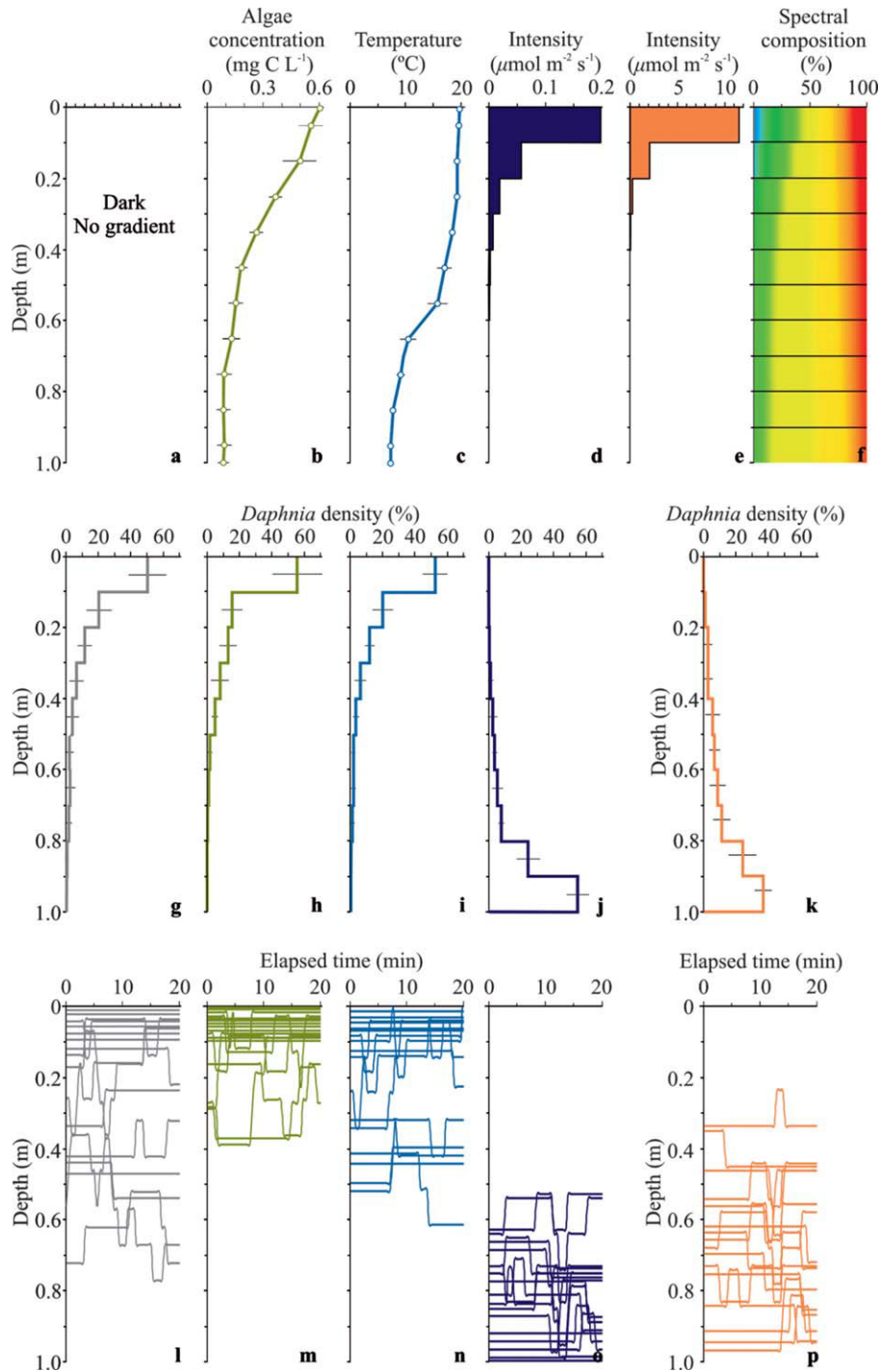
range light) was slowly produced between the 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> hours of each of the final experiments to reach the final shape at the beginning of the 6<sup>th</sup> hour. None of these gradients changed their parameters during the last 2 h (between hour 6 and 8). The assessment of *Daphnia* distribution at the population level (once for each treatment) and the observation of depth selection of an individual (40 times during 20-min-long series with observations taken every 0.5 min) in each of the final experiments were obtained between hour 3 and 4 in the absence of any gradient and between hour 7 and 8 in one of the gradients. Therefore, in the final experiments, four times more observations were made in the absence of a gradient than in its presence.

A number of 5-d old individuals (juveniles just before deposition of eggs into brood cavities) of the same clone of *Daphnia longispina* (clone L 004) were used. The clone was isolated in September 2008 from zooplankton samples taken from Lake Roś, a typical stratified meso-eutrophic lake known for high densities of planktivorous fish (Jachner 1991). The *Daphnia* were grown in laboratory batch cultures in 4-L glass jars with *S. obliquus* (1 mg C L<sup>-1</sup>) to produce age-synchronized individuals. The *Daphnia* cultures were kept and all experiments were performed in media based on 0.2 µm Millipore mesh-filtered water from a eutrophic lake (Lake Szcześliwice in Warsaw) that had been conditioned to remove possible traces of information on crowding or fish predation (fish kairomones) by storage and aeration for more than 2 weeks before starting the experiments. All experiments had fish-conditioned water (for 24 h before each experiment with one 6–8 cm *Rutilus rutilus* at a density of 1 individual 100 L<sup>-1</sup>). As the chemical nature of kairomones is still unknown (Pohnert et al. 2007; Maszczyk and Bartosiewicz 2012), the concentration of kairomones in subsequent sectors cannot be estimated. However, all media flowing to the subsequent depth sectors were prepared from the same “fish water”; hence it can be assumed that the concentration of kairomones was uniform along the whole column.

#### Statistical analysis

To statistically test the similarity of the gradients of algal food (Fig. 4b), temperature (Fig. 4c), light intensity in the UV or in the visible range (Fig. 4d or e, respectively), as well as the light spectrum in the visible range (Fig. 4f) of the experimental conditions with the corresponding gradients observed in Lake Roś, a general linear model (GLM, ANCOVA) was used with treatment (lake or experimental apparatus) as a categorical variable.

To test the effect of turbulence caused by flow-through on *Daphnia* distribution, a repeated measures ANCOVA was performed, with *Daphnia* density at subsequent depths as a dependent variable, and treatment (with or without flow-through), column (left or right), and repetition (nested in columns) as categorical variables, with depth (mean in each sector) as a covariate. The same analysis was also used to test



**Fig. 4.** Gradients of biotic and abiotic conditions created during the experiments (**b–f**, preceded by an empty panel (**a**) which represents treatment without any gradient), the distribution of 5-d-old *D. longispina* in the experiments with a mean density of 40 ind.  $\times$  L $^{-1}$  (**g–k**), as well as depth selection by an individual *Daphnia* in eight replications with a single individual in each column (**l–p**). The mean ( $\pm$  1 SD) gradients of algal concentration (**b**, green line), and temperature (**c**, blue line) were combined from all three experiments for *Daphnia* distribution at the population density level and from three randomly chosen experiments (from a total of 8) for individual depth selection (all for both columns). The mean gradients of light intensity in UV (**d**, purple boxes), and in the visible range (**e**, orange boxes) were also combined for all three experiments for *Daphnia* distribution at population density level and from three randomly chosen experiments for individual depth selection (all for both columns). The mean gradient of the light spectrum (**f**) was combined only for two randomly chosen experiments—one for distribution and one for individual depth selection (all for both columns). The mean ( $\pm$  1 SD) distribution was combined for all three experiments for each treatment, and the results for individual depth selection were shown for all eight experiments (all for both columns). The colors of the boxes and lines for both types of experiment correspond to the colors attributed to the gradients.

**Table 1.** Results of a general linear model, repeated ANCOVA measures ( $F$ ,  $df$ , Error, and  $P$ ) for differences in the shape of the gradients (of algae, temperature, light intensity and spectrum in the visible range, and UV) between columns (column), as well as in *Daphnia* distribution in the absence and the presence of flow-through, algae gradient, thermocline, light intensity gradient in the visible range, and UV gradient.

Effect of:	$F$	$df$	Error	$p$
Column	<1.7	16	56	>0.2253
Flow-through	<0.1	1	73	0.8495
Algae gradient	0.1	1	108	0.8138
Thermocline	0.1	1	108	0.9106
Visible light gradient	111.2	1	108	0.0001
UV gradient	113.2	1	108	<0.0001

whether there were differences between the two columns in the gradients of algal food, temperature, light intensity, and spectral proportions in the visible or UV range. For this analysis, the column was treated as a categorical variable, repetition was nested in columns, and depth was used as a covariate. To compare the distribution of a *Daphnia* population in the control (Fig. 4g) and in each of the gradients (Fig. 4h–k), I used the categorical variables of treatment (the presence or absence of a gradient), column, and repetition (nested in columns). The nonparametric Mann–Whitney  $U$  test was used to compare the mean depth selected by an average individual *Daphnia* (mean from 16 ind.) during 20 min in the control (Fig. 4l) and in the presence of each gradient separately (Fig. 4m–p). It was also used to compare the distribution of the *Daphnia* population (200 ind. in the column) and the mean distribution of depth selected by single individuals during 20 min of observation in each of the treatments. To find the general pattern of individual *Daphnia* movements in the vertical column in each of the five treatments (no gradient, gradients of food concentration, temperature, light intensity in the UV and visible range), a two-step procedure was performed. First, the mobility (as the sum of depth changes during 20 min of observation) and the variability of the vertical position (as the standard deviation in depth selection) for each individual were assessed. Second, the mean and standard deviation for both parameters were performed for a group of 16 individuals in each treatment.

## Results

### Similarity of the experimental gradients to natural conditions

The results of the simple experiments described here proved the functioning of the apparatus. The statistical analysis (GLM, ANCOVA) did not reveal any significant differences in the gradients of algae, temperature, and light intensity between the experimental apparatus and the chosen field scenario in Lake Roś, or in the intensity of UV light between

the experimental apparatus and the chosen field scenario in Lake Czarny Staw, or in the spectrum of light between the experimental apparatus and the chosen field scenario in Lake Roś ( $F_{6,7} < 32.6$ ,  $p > 0.1331$ ). The relatively greater power of statistical analysis was used to compare temperature gradients ( $Sp = 0.362$ ,  $n = 22$  for the lake and  $n = 22$  for the apparatus), light intensity gradients ( $Sp = 0.334$ ,  $n = 22$  for the lake and  $n = 22$  for the apparatus), light spectrum gradients, where it was lower ( $Sp = 0.291$ ,  $n = 10$  for the lake and  $n = 20$  for the apparatus) and UV range light ( $Sp = 0.270$ ,  $n = 20$  for the lake and  $n = 20$  for the apparatus). The lowest result (but still strong enough) was in the comparison of algal gradients ( $Sp = 0.150$ ,  $n = 34$  for the lake and  $n = 66$  for the apparatus).

### The responses of *Daphnia* to the gradients

There was no statistically significant difference in the gradients between the two columns, either in the gradient of algae, temperature, light intensity in visible or UV range, or in the gradient of light spectrum (Table 1). The distribution of *Daphnia* was similar in the presence and the absence of flow-through (Table 1). The distribution of *Daphnia* did not significantly differ in the algae gradient (Fig. 4h) or in the temperature gradient (Fig. 4i) from the absence of a gradient (the control; Fig. 4g, Table 1). However, the distribution was strongly affected by the presence of the visible light gradient (Table 1, Fig. 4k), with the majority of individuals within a group selecting the bottom sectors of the columns, displaying negative phototaxis. This was quite consistent with observations of the effect of sunlight (Ringelberg 1999; Cohen and Forward, 2009), as well as with the effect of artificial light within the spectrum imitating sunlight in large- (e.g., plankton towers, Lampert and Loose 1992) and small-scale (“plankton organ,” Dawidowicz and Loose 1992) experimental setups. This, however, contradicts the observations of other small-scale setups in which artificial monochromatic light in the visible range induced positive phototaxis of *D. magna* (e.g., Storz and Paul 1998; Itoh and Hisama 2010) and *Artemia* (e.g., Aiken and Hailman 1978; Forward and Hettler 1992). The effect of light in the UV-A range was even stronger than in the visible range, especially as its intensity on subsequent depths of the UV-A light was approximately 15 times weaker than the visible light (Table 1, Fig. 4j).

The difference between the mean depth selected by an average individual *Daphnia* during 20 min in the control (Fig. 4l) and in the presence of the algae gradient (Fig. 4m), as well as in the control and in the presence of the temperature gradient (Fig. 4n) was only slightly significant (M.–W. test,  $U = 64$ ,  $p < 0.0453$ ). However, depth selection was strongly affected by the presence of the light gradient in the visible range (M.–W. test,  $U = 15$ ,  $p = 0.0003$ , Fig. 4p), and even stronger in the UV gradient (M.–W. test,  $U = 2$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 4o).

**Table 2.** Mobility (sum of depth changes during 20 min) and variability of vertical position (standard deviation of depth selection) in different conditions: in the absence of any gradient (No gradient), and in the presence of the gradient of algae (Food), temperature (Temp), light intensity in UV (UV), and visible light (VIS) range. Each group consisted of 16 *Daphnia* individuals (mean  $\pm$  1SD).

Treatment	Mobility		Variability of position	
	Mean	SD	Mean	SD
No gradient	2.88	3.66	0.50	0.68
Food	1.75	2.17	0.29	0.41
Temp	2.00	2.19	0.39	0.42
UV	2.44	1.51	0.46	0.32
VIS	2.56	1.32	0.47	0.14

Although the effect of exploitation was excluded due to the constant flow-through during the experiments, it could be expected that interference competition (as passive competition for space) in the algae gradient may result in a more even distribution at higher *Daphnia* densities. A similar effect could be expected in the gradients of temperature and UV-A radiation, and even in the absence of any gradient, as the distribution in each treatment turned out to be uneven. Moreover, according to theoretical (Giske et al. 1997) and experimental (Gliwicz et al. 2006; Gliwicz et al. 2012) studies, it could also be expected that the effect of predation risk by visually-oriented planktivores on *Daphnia* distribution depends on their density. However, the results of experiments described in this study have not revealed any difference between the distribution of *Daphnia* at low (0.2 ind. L<sup>-1</sup>, single individual in a column) and high (40 ind. L<sup>-1</sup>, 200 individuals in a column) density in any treatment (M.-W. test,  $U = 16$ ,  $p \geq 0.2051$ ), which may suggest the negligible effect of *Daphnia* density on their distribution either due to interference competition or density-dependent mortality risk.

#### *Daphnia* mobility

The apparatus also allowed another quite interesting set of results to be obtained on the individual vertical movement of *Daphnia* that would be difficult to acquire in other systems. The mean mobility and the mean variability of vertical position were highest in the group of individual *Daphnia* when no gradient was present, suggesting the greatest motivation to seek different depths relative to the other treatments. The variability of both the mobility and the position were also the highest in this group (Table 2). The lowest mean mobility and mean variability of vertical position was found for the group of *Daphnia* in the gradient of food concentration (Table 2), suggesting the greatest motivation to seek a different depth relative to other treatments.

Although the mean mobility of *Daphnia* was high in the visible range light gradient, the mean variance in position was low (relative to other gradients, Table 2), which means that they were very mobile, but their movements proceeded in a small range of depths. Both the SD of mobility and of the variance in position were lowest for *Daphnia* in this gradient (Table 2), suggesting the greatest similarity in their migration pattern.

#### Discussion

This article presents a new device: a miniaturized experimental system of twin vertical plankton columns, a system which fulfills a variety of structural conditions that improve the three general functions of an ideal comprehensive experimental system in which to study zooplankton depth selection. The first significant benefit of the system is the possibility of its use in experimental studies on depth selection behavior with minimal artificial restriction of individual movement compared to other miniaturized systems described in the literature. The most important structural advantages that improve the first function are: (1) the vertical rather than horizontal orientation of both columns, (2) their greater volume (5 L) than that of the majority of other systems in use, (3) the lack of obstacles restricting movement inside the column, and (4) the presence of flow-through adjusted in such a way that it does not affect *Daphnia* depth selection.

The second significant attribute of the system is the opportunity to study (simultaneously or in separate experiments) the process of habitat selection by a single animal in the course of its search for the most profitable depth, as well as observing a gradual change in the depth distribution of a group of conspecifics, also at low population density. To demonstrate this, I have chosen the simplest solution by making a separate observation of an individual, as well as of a group of individuals in different experiments. However, one should bear in mind that the possibility exists of simultaneously observing an individual in its quest for a preferred depth within a group, and of a change in the depth distribution of the group using one of two methods: first, through the observation of a single individual within a cohort of other individuals of explicitly different size, and second, through the labeling of an individual with fluorescent nanoparticles (Ekvall et al. 2013). The most important structural advantages that improve the second function are: (1) the proper height and volume of each column, and (2) all the details of the construction of the apparatus that allows swift enumeration of the animals in subsequent depths (e.g., the flattened shape of each column, the construction of the front wall from highly transparent scratch resistant quartz-glass, and the installation of an infra-red LED matrix in the space between the two columns that laterally illuminates an animal, such as *Daphnia*).



The third significance of the system is the possibility to create stable and reproducible gradients of algae, temperature, predation risk from visually-oriented planktivores, and UV radiation in the system, each independent from another, and each qualitatively reflecting ambient conditions in the field. This function is proven by the results of the simple experiments performed in the course of this study. Although the literature provides only a few descriptions of miniaturized experimental systems that would permit the creation of a gradient of UV radiation (e.g., Rhode et al. 2001), as well as a gradient of temperature (e.g., Dawidowicz and Loose 1992), the new apparatus is the first that also allows the production of the gradients of algae and light (its spectrum and intensity), each fulfilling all aforementioned conditions. The most important new benefits of the system are the opportunity to create any temporal and spatial light intensity and spectrum gradients (as major components of the predation risk gradient), as well as the possibility to generate any algal gradient, including the typical gradient with its maximum in the near surface layers. The most important structural advantages that improve the third function are: (1) the presence of different light sources, filters, mirrors, and optical fibers to establish a gradient of light that provides reliable information on predation risk at subsequent depths, and (2) the chance to use two flows, one from the bottom to the top of each column with different types of media in subsequent depths, and one with the internal circulation of the medium through stirring within each sector of the column to create algal gradients independent of the viscosity gradient due to thermal stratification. The possibility to use (one or more) flow-through with different types of media in subsequent depths also permits the potential generation of additional gradients that were not created in this system so far (e.g., salinity, toxins, and oxygen saturation).

Although the apparatus is quite complex, it allows investigators to create a comprehensive, tested system for studying proximate and ultimate consequences of depth selection in zooplankton and possibly also some aspects of algal and bacterial ecology. Adaptation of this apparatus should greatly reduce the time (up to 1 month) and cost (up to 3–4000 US dollars) of construction in relation to other untested innovative systems, as the testing of new apparatus is the most time- and cost-consuming stage. The functioning of the apparatus could be greatly improved by the installation of a system that enables programming and automatic control of algal and temperature gradients during experiments, although such a solution would significantly increase the costs of construction. The system could be composed of embedded sensors of algal concentration and temperature at subsequent depths connected to a programmable driver with the control panel on the computer, as well as to peristaltic pumps (responsible for the flow rate of media) and the water pump (responsible for the temperature gradient inside the columns). Conversely, other aspects of the apparatus could

be simplified. For example, one might assume that zooplankters perceive predation risk only as a consequence of a kairomone concentration and light intensity, but not as a consequence of the light spectrum. With this assumption, the system could be simplified by eliminating rather sophisticated elements of different light sources and optical filters. Also, some of the tested solutions presented here could be replaced with others that might be even more adequate. For example: (1) columns could be made with transparent polycarbonate, which is more durable than acrylic, (2) simple diffusers (round and flat containers with narrow apertures at the end of each inflow) could be replaced with more sophisticated and possibly more effective diffusers (e.g., containers that are incorporated into the side wall of a column, each containing an internal drill which mixes the medium), and (3) the present cooling system made of a steel container located at the bottom of each column connected with a cooler in a loop could be replaced by a simpler solution based on cooling and heating the media before they are pumped to the subsequent part of a column.

In conclusion, the experimental system of the miniature “plankton columns” described in this study appears to be a superior tool in relation to large-scale apparatuses for investigating many aspects of plankton ecology. Among the most important advantages are: (1) the relative ease of making a replica of the system in another laboratory; (2) the possibility of tracking individual planktonic animals in the gradients; (3) the ability to perform experiments with gradients that are independent of one another; and, (4) the ability to transport the system to other locations (e.g., field laboratories).

## References

- Aiken, R. B., and J. P. Hailman. 1978. Positive phototaxis of the brine shrimp *Artemia salina* to monochromatic light. *Can. J. Zool.* **56**: 708–711. doi:10.1139/z78-098
- Balch, N., C. M. Boyd, and M. Mullin. 1978. Large-scale tower tank systems. *Rapp. P.V. Reun. Cons. Int. Explor. Mer.* **173**: 13–21.
- Bukovinszky, T., N. R. Helmsing, R. A. Grau, E. S. Bakker, T. M. Bezemer, M. Vos, H. Uittenhout, and A. M. Verschoor. 2013. A device to study the behavioral responses of zooplankton to food quality and quantity. *J. Insect Behav.* **26**: 453–465. doi:10.1007/s10905-012-9366-0
- Cohen, J. H., and R. B. J. Forward. 2009. Zooplankton diel vertical migration—a review of proximate control. In R.N. Gibson, R.J.A. Atkinson, and J.D.M. Gordon [eds.], *Oceanography and marine biology: an annual review*, vol 47. CRC press, Boca Raton.
- Cuddington, K. M., and E. McCauley. 1994. Food-dependent aggregation and mobility of the water fleas *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex*. *Can. J. Zool.* **72**: 1217–1226. doi:10.1139/z94-163

- Dawidowicz, P., and C. L. Loose. 1992. Metabolic costs during predator-induced diel vertical migration in *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.* **37**: 665–669. doi:[10.4319/lo.1992.37.3.0665](https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.3.0665)
- De Meester, L., L. Weider, and R. Tollrian. 1995. Alternative antipredator defenses and genetic-polymorphism in a pelagic predator-prey system. *Nature* **378**: 483–485. doi:[10.1038/378483a0](https://doi.org/10.1038/378483a0)
- De Meester, L., P. Dawidowicz, E. van Gool, and C. L. Loose. 1998. Ecology and evolution of predator-induced behavior of zooplankton: Depth selection and diel vertical migration in *Daphnia*. In C.D. Harvell and R. Tollrian [eds.], *Consequences of inducible defences for population biology*. Princeton Univ. Press.
- Dodson, S.I., S. Ryan, R. Tollrian, and W. Lampert. 1997. Individual swimming behavior of *Daphnia*: Effects of food, light and container size in four clones. *J. Plankton Res.* **19**: 1537–1552. doi:[10.1093/plankt/19.10.1537](https://doi.org/10.1093/plankt/19.10.1537)
- Ekvall, M.T., G. Bianco, S. Linse, H. Linke, J. Bäckman, and L. A. Hansson. 2013. Three-dimensional tracking of small aquatic organisms using fluorescent nanoparticles. *PLoS ONE* **8**: e78498. doi:[10.1371/journal.pone.0078498](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078498)
- Englund, G., and S. D. Cooper. 2003. Scale effects and extrapolation in ecological experiments. *Adv. Ecol. Res.* **33**: 161–213. doi:[10.1016/S0065-2504\(03\)33011-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(03)33011-9)
- Forward, R. B., Jr., and W. F. Hettler, Jr. 1992. Effects of feeding and predator exposure on photoresponses during diel vertical migration of brine shrimp larvae. *Limnol. Oceanogr.* **37**: 1261–1270. doi:[10.4319/lo.1992.37.6.1261](https://doi.org/10.4319/lo.1992.37.6.1261)
- Giske, J., R. Rosland, J. Berntsen, and Ø. Fiksen. 1997. Ideal free distribution of copepods under predation risk. *Ecol. Model.* **95**: 45–59. doi:[10.1016/S0304-3800\(96\)00027-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(96)00027-0)
- Gliwicz, Z. M., P. Dawidowicz, and P. Maszczyk. 2006. Low-density anti-predation refuge in *Daphnia* and *Chaoborus*? *Arch. Hydrobiol.* **167**: 101–114. doi:[10.1127/0003-9136/2006/0167-0101](https://doi.org/10.1127/0003-9136/2006/0167-0101)
- Gliwicz, Z. M., P. Maszczyk, and W. Uszko. 2012. Enhanced growth at low population density in *Daphnia*: The absence of crowding effects or relief from visual predation? *Freshw. Biol.* **57**: 1166–1179. doi:[10.1111/j.1365-2427.2012.02783.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2012.02783.x)
- Grossart, H. P., C. Dziallas, F. Leunert, and K. W. Tang. 2010. Bacteria dispersal by hitchhiking on zooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 11959–11964. doi:[10.1073/pnas.1000668107](https://doi.org/10.1073/pnas.1000668107)
- Gutierrez, M. F., A. M. Gagneten, and J. C. Paggi. 2011. Behavioural responses of two cladocerans and two copepods exposed to fish kairomones. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* **44**: 289–303. doi:[10.1080/10236244.2011.633770](https://doi.org/10.1080/10236244.2011.633770)
- Harris, J. E., and U. K. Wolfe. 1955. A laboratory study of vertical migration. *Proc. R. Soc. Lond. B* **144**: 329–354. doi:[10.1098/rspb.1955.0062](https://doi.org/10.1098/rspb.1955.0062)
- Hurlbert, S. H. 1984. *Pseudoreplication and the design of ecological field experiments*. *Ecol. Monogr.* **54**: 187–211. doi:[10.2307/1942661](https://doi.org/10.2307/1942661)
- Hutchinson, G. E. 1967. *A Treatise on Limnology*. Volume 2: Introduction to Lake Biology and the Limnoplankton. John Wiley and Sons, New York, NY, 1115 pp.
- Itoh, A., and H. Hisama. 2010. Motion control of *Daphnia magna* by blue LED light. *J. Aero Aqua Bio-mechanisms* **1**: 93–98. doi:[10.5226/jabmech.1.93](https://doi.org/10.5226/jabmech.1.93)
- Jachner, A. 1991. Food and habitat partitioning among juveniles of three fish species in the pelagial of a mesotrophic lake. *Hydrobiologia* **226**: 81–89. doi:[10.1007/BF00006809](https://doi.org/10.1007/BF00006809)
- Lampert, W. 2011. *Daphnia*: Development of a model organism in ecology and evolution. In O. Kinne [ed.], *Excellence in ecology*, Book 21. International Ecology Institute.
- Lampert, W., and C. J. Loose. 1992. Plankton towers: Bridging the gap between laboratory and field experiments. *Arch. Hydrobiol.* **126**: 53–66.
- Lampert, W., and J. Grey. 2003. Exploitation of a deep-water algal maximum by *Daphnia*: A stable-isotope tracer study. *Hydrobiologia* **500**: 95–101. doi:[10.1023/A:1024644815548](https://doi.org/10.1023/A:1024644815548)
- Larsson, P. 1997. Ideal free distribution in *Daphnia*? Are daphnids able to consider both the food patch quality and the position of competitors? *Hydrobiologia* **360**: 143–152. doi:[10.1007/978-94-011-4964-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-011-4964-8_16)
- Maszczyk, P., and M. Bartosiewicz. 2012. Threat or treat: The role of fish exudates in the growth and life history of *Daphnia*. *Ecosphere* **3**: 91. doi:[10.1890/ES12-00146.1](https://doi.org/10.1890/ES12-00146.1)
- Neary, J., K. Cash, and E. McCauley. 1994. Behavioural aggregation of *Daphnia pulex* in response to food gradients. *Funct. Ecol.* **8**: 377–383. doi:[10.2307/2389831](https://doi.org/10.2307/2389831)
- Pohnert, G., M. Steinke, and R. Tollrian. 2007. Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends Ecol. Evol.* **22**: 198–204. doi:[10.1016/j.tree.2007.01.005](https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.01.005)
- Price, H. J. 1989. *Swimming behavior of krill in response to algal patches: A mesocosm study*. *Limnol. Oceanogr.* **34**: 649–659. doi:[10.4319/lo.1989.34.4.0649](https://doi.org/10.4319/lo.1989.34.4.0649)
- Rhode, S. C., M. Pawlowski, and R. Tollrian. 2001. The impact of ultraviolet radiation on the vertical distribution of zooplankton of the genus *Daphnia*. *Nature* **412**: 69–72. doi:[10.1038/35083567](https://doi.org/10.1038/35083567)
- Ringelberg, J. 1999. The photobehaviour of *Daphnia* spp. as a model to explain diel vertical migration in zooplankton. *Biol. Rev.* **74**: 397–423. doi:[10.1111/j.1469-185X.1999.tb00036.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00036.x)
- Roozen, F., and M. Lüring. 2001. Behavioural response of *Daphnia* to olfactory cues from food, competitors and predators. *J. Plankton Res.* **23**: 797–808. doi:[10.1093/plankt/23.8.797](https://doi.org/10.1093/plankt/23.8.797)
- Schatz, G. S., and E. McCauley. 2007. Foraging behavior by *Daphnia* in stoichiometric gradients of food quality. *Oecologia* **153**: 1021–1030. doi:[10.1007/s00442-007-0793-0](https://doi.org/10.1007/s00442-007-0793-0)
- Storz, U. C., and R. J. Paul. 1998. Phototaxis in water fleas (*Daphnia magna*) is differently influenced by visible and UV light. *J. Comp. Physiol. A.* **183**: 709–717. doi:[10.1007/s003590050293](https://doi.org/10.1007/s003590050293)

van Gool, F. T. J., and J. Ringelberg. 1996. Daphnids respond to algae-associated odours. *J. Plankton Res.* **18**: 197–202. doi:[10.1093/plankt/18.2.197](https://doi.org/10.1093/plankt/18.2.197)

### Acknowledgments

I would like to thank E. Babkiewicz for assistance with the experimental work, M. Bartosiewicz, Z. M. Gliwicz, J. Radzikowski, and W. Wurtsbaugh for insightful comments that helped to improve this manuscript, M. Sokół and T. Wyszomirski for statistical support as well as M. Januszewski, M. Ostrowski, and M. Ślusarczyk for technical advice. This research was supported by grants from the PNC to P. Maszczyk (2014/12/T/NZ8/00287 and 2014/13/N/NZ8/02462), as well as to Z. M.

Gliwicz (2011/03/B/NZ8/02093 and 2014/15/B/NZ8/00245). The final part of this study was carried out at the Biological and Chemical Research Center, University of Warsaw, established within a project co-financed by the EU European Regional Development Fund under the 2007-2013 Innovative Economy Operational Program.

*Submitted 8 June 2015*

*Revised 19 September 2015*

*Accepted 24 November 2015*

*Associate editor: Gordon Taylor*

#### **VI.4. Załącznik 4**

Gliwicz Z.M., Maszczyk P., Uszko W. 2012 – Enhanced growth at low population density in *Daphnia*: the absence of crowding effects or relief from visual predation? – *Freshwater Biology* 57: 1166–1179.

# Enhanced growth at low population density in *Daphnia*: the absence of crowding effects or relief from visual predation?

Z. MACIEJ GLIWICZ, PIOTR MASZCZYK AND WOJCIECH USZKO

Department of Hydrobiology, University of Warsaw, Warszawa, Poland

## SUMMARY

1. It has been suggested that chemical information from crowded populations of an animal such as *Daphnia* carries a cue indicating imminent food limitation, and we suggest that in the presence of fish kairomones, it may also convey a hint of the need to enhance antipredation defences.

2. We performed two-factorial experiments with *Daphnia* grown in flow-through plankton chambers in medium containing high levels of *Scenedesmus* food plus chemical information on either low or high population density levels and in the presence or absence of fish chemical cues (kairomones) and recorded (i) the effects on *Daphnia* growth rate and reproduction, and (ii) the effects on *Daphnia* depth selection. Further depth-selection experiments were performed to test the reaction of *Daphnia* to crowding information at different *Daphnia* concentrations and to test its effect on daytime and night-time depth selection by different *Daphnia* instars in the presence of kairomones.

3. The effects of crowding information alone (in the absence of kairomones) were weak and were not significantly strengthened by the addition of kairomones. The effects of kairomones alone (in the absence of crowding information) were much stronger and were increased by the presence of crowding chemicals: *Daphnia* selected greater depths in daylight (the later the instar and the larger its body size, the greater the depth), their body growth was slower and daily reproductive investment reduced, compared with *Daphnia* grown in the absence of crowding information. This suggested that crowding chemicals carry a cue indicating the need to invest more into antipredation defences.

4. The adaptive significance of these effects was confirmed by the differential vulnerability to predation of the *Daphnia* when offered as prey to live roach after being grown for 6 days either in the presence (higher vulnerability) or in the absence (lower vulnerability) of information on high density.

5. The strong interaction between crowding information and fish kairomones may be explained either as the reaction to a cue indicating impending food stress or as the reaction to a signal of increased predation risk. While the former scenario is already known from crowding studies, the latter is a novel idea that stems from the old concept of 'low-density anti-predation refuge'. The two scenarios are not mutually exclusive: each stems from the need to invest in survival rather than in growth and reproduction [Corrections were made to this paragraph after first online publication on 4 April 2012].

**Keywords:** crowding, defence costs, density dependence, predation risk, refuge

## Introduction

Stress and other deleterious effects of crowding have been of interest to ecologists since this phenomenon was first reported by Frank (1952, 1957) and revisited by Folt &

Goldman (1981). Their suggestion that the individual fitness of an animal such as *Daphnia* is lower at high population densities owing to stress resulting from an approaching decline in food levels has been pursued by others who have experimentally demonstrated that

Correspondence: Z. Maciej Gliwicz, Department of Hydrobiology, University of Warsaw, Banacha 2, 02-097 Warszawa, Poland. E-mail: z.m.gliwicz@uw.edu.pl

Present address: Wojciech Uszko, Department of Ecology and Environmental Science, Umeå University, SE-90187 Umeå, Sweden.

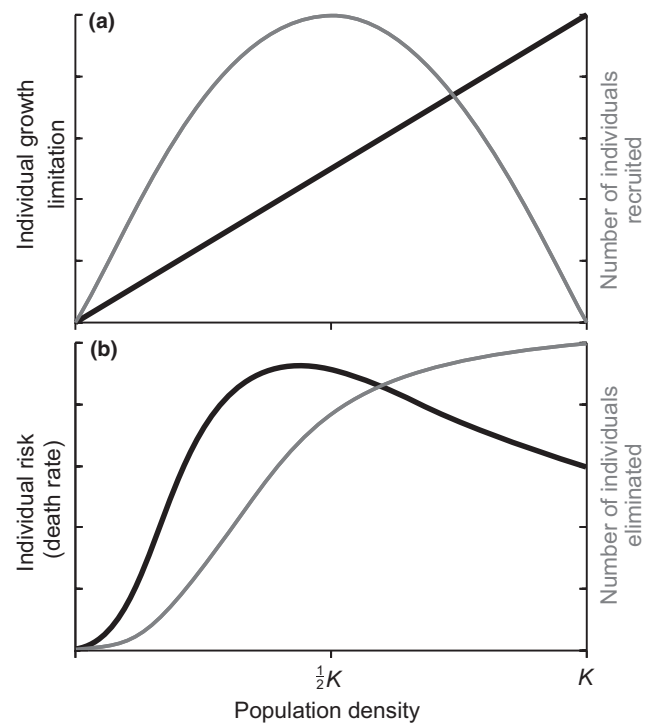


information on high population density instigates a decline in ingestion rate (in *Daphnia Schoedleri* G.O. Sars – Hayward & Gallup, 1976; *Daphnia pulex* Leydig – Helgen, 1987; Ban *et al.*, 2008; or *Daphnia carinata* King & *Daphnia lumholtzi* G.O. Sars – Matveev, 1993), the rate of individual body growth (Burns, 1995, 2000), fecundity (Seitz, 1984; Lee & Ban, 1999; Rose, Warne & Lim, 2002) and the intrinsic rate of population increase (Boersma, 1999; Lüring *et al.*, 2003). The effects of these declines are reflected in the linear increase in the magnitude of individual growth limitation by resource and interference competition that stem from the logistic model of population growth up to the limits of carrying capacity (Fig. 1a).

Alternatively, the phenomenon of growth limitation at high population densities may be attributed to the need to activate antipredation defences at the cost of lost feeding opportunity and more energy allocated to defence when density increases. This is most likely within the range of low densities where the increase in individual risk of predation is most rapid, according to Holling's (1959) type III functional response (Fig. 1b). This fast increase in individual risk may be further accelerated by an aggregative (numerical) response of the predator in space, which is well known for planktivorous fish and their *Daphnia* prey (Gliwicz & Wrzosek, 2008).

While the dependence of individual growth limitation on density is linear up to the point where further growth becomes limited to that needed to sustain population abundance at the carrying capacity (Fig. 1a), the density dependence of individual risk has an initial phase of rapid increase followed by a gradual decline at high densities (Fig. 1b). Even though this decline would be moderated by the likely numerical responses of predators attracted to prey aggregations, it is difficult to judge the relative importance of the two scenarios because the values of the two factors, growth limitation and predation risk, are not necessarily additive at high population densities. They are additive when extremely low densities are compared with intermediate ones, around  $\frac{1}{2}N$ , but not when the intermediate densities are compared with those near carrying capacity (Fig. 1a,b), when prey should benefit from the dilution of risk and predator confusion (Hamilton, 1971).

In comparison with the ideas of 'safety in a group' and 'high-density refuge', the notion of 'low-density refuge', based on an original idea of Rosenzweig & MacArthur (1963), has been less frequently discussed. The latter was first used to explain different densities of marine benthic molluscs by Lipcius & Hines (1986), Hines *et al.* (1997), Seitz *et al.* (2001) and Kuhlman & Hines (2005). Later, it was also suggested as a possible explanation for depth-selection behaviour in *Daphnia* (Gliwicz, Dawidowicz & Maszczyk,



**Fig. 1** Shift in the magnitude of individual growth limitation by competition (a) and the magnitude of individual risk to predation (b) along the prey population density spectrum within densities below the carrying capacity  $K$  (black lines), each taken as a function of the number of individuals recruited to (birth rate,  $b$ ) or eliminated from (death rate,  $d$ ) a population per unit of time (grey lines). The magnitude of individual growth limitation by the resource and the interference competition (black line in a) is an inversion of the function of per capita growth rate along the density spectrum that assures logistic growth of a population up to the carrying capacity level,  $K$  (number of individuals recruited per unit of time on population density level, grey line). The magnitude of individual risk to predation (black line in b) is derived from Holling's (1959) type III functional response depicting the change in a predator's capture rate (number of individuals eliminated, grey line) as captures per individual of the prey population (each value of the ordinate divided by the respective value of the abscissa, an inspiration from Young *et al.*, 1994). The range of low densities where prey benefit from a 'low-density antipredation refuge' (individual risk reduced to zero) can be extended to the right when it is assumed that the predator ignores the prey up to a critical prey density level that is equal to either the number of prey being able to find a refuge (Rosenzweig & MacArthur, 1963) or the number when the encounter rate of a given prey with the predator becomes too infrequent for it to be retained in the predator's diet (Gliwicz *et al.*, 2010).

2006), but this was done with no reference to the possibility of crowding effects as an alternate explanation of the different depths selected at low and high population densities and with no effort to assess the costs of antipredator defences.

In this study, we hypothesise that the reduced risk of predation at low population density should allow *Daphnia* prey to abandon costly defences induced by fish presence,

such as reduced rate of growth resulting in a decline in daily reproductive investment owing to smaller body size at maturity (Machaček, 1991; Stibor, 1992) and descent into deeper strata that are safer because of light reduction but cooler and less food proficient (De Meester *et al.*, 1999). The ability to assess whether the risk has been reduced as a result of low population density would allow *Daphnia* prey to increase their fitness by feeding closer to the surface with more food and at a higher temperature, and grow and reproduce as fast as is permitted by food levels alone, without the stress caused by the fear of predation that might be conveyed by crowding information. Hence, it would allow *Daphnia* to take advantage of 'the low-density antipredation refuge'. This optimum growth and reproduction would ensure high reproductive success, at least until high population density was restored and stress produced by a mixture of fish kairomones and crowding infochemicals caused antipredation defences to be switched on again.

The first hypothesis tested in this study is (i) that the growth and fecundity of *Daphnia* should decline in the presence of information on high density to a greater extent in the presence of fish kairomones than in their absence, suggesting that the effects of predation risk and the effects of crowding are additive, (ii) that this would be caused by the activation of antipredation defences, including descent to safer, less-well-illuminated strata of the water column, and (iii) that reduced growth and fecundity at high density would reflect the costs of antipredation defences that are paid by *Daphnia* at such density levels. Data to test this hypothesis were gathered from an experimental assessment of whether *Daphnia* at high population density grow more slowly (*growth rate*), reduce their daily reproductive investment (*reproduction*) and select greater day-time depths (*depth selection*).

The second hypothesis we test is that the use of a 'low-density antipredation refuge', by giving up costly antipredator defences to increase fitness through faster growth and reproduction, may be a risky strategy. To check whether increased fitness at low density could increase mortality caused by unexpected predation, the vulnerability of *Daphnia* grown in the presence or absence of chemical information on high density was compared (*Vulnerability to fish predation*).

## Methods

### The approach

*Daphnia* were raised individually from the age of 0.5 days to the adult age of 5–7 days, when their body weight,

individual growth rate and fecundity were assessed. They were grown in a flow-through system in medium containing identical non-limiting levels of algal food (the initial food level of  $1 \text{ mg C L}^{-1}$ ), but different information on population density, both in the presence and in the absence of fish kairomones. The diluted water from the crowded population could not contain alarm substance from dead *Daphnia* because alarm substance is known to be released only by live *Daphnia* when being captured by fish (Laforsch, Beccara & Tollrian, 2006) or crushed while in the process of alarm substance production (Pijanowska, 1997). In growth experiments, *Daphnia* were grown in a non-thermally stratified water column. In depth-selection experiments, they were grown in a thermally stratified water column, and the depth selected by each individual was registered every second hour. Chemical information related to high population density was prepared by diluting crowding water obtained from a mass *Daphnia* batch culture.

### Experimental animals

All experiments were performed using the same clone of *Daphnia hyalina*  $\times$  *galeata* (clone HG011) isolated from the hypolimnion of Lake Swiecajty in the Great Mazurian Lakes, a lake system known for high densities of planktivorous fish (smelt, *Osmerus eperlanus* L. and roach, *Rutilus rutilus* L.; Gliwicz, 2003; Gliwicz, Szymanska & Wrzosek, 2010). *Daphnia* were grown in the laboratory in batch cultures in 3-L glass jars at high *Scenedesmus obliquus* food levels ( $1 \text{ mg C L}^{-1}$ ) to produce thousands of age-synchronised individuals. The *Daphnia* cultures and all experiments were performed in media based on  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  Millipore mesh-filtered water from Lake Gora near Warsaw ( $52^{\circ}27' \text{ N}$ ,  $20^{\circ}46' \text{ E}$ ) that had been conditioned by storage and aeration for 2 weeks to remove possible traces of information on crowding or fish predation (fish kairomones).

For both the growth rate assessment and depth-selection experiments, mass batch cultures of the same *Daphnia* clone were used as sources of water that had been chemically altered by a high density of conspecifics. Chemical information on population densities of 30–120 ind.  $\text{L}^{-1}$  used in the experimental system was prepared by diluting this crowding water with  $0.45\text{-}\mu\text{m}$  Millipore mesh-filtered conditioned lake water. Mass *Daphnia* cultures of diverse body size and mixed-age individuals were started 48 h before each experiment and kept at a constant food level of  $1 \text{ mg C L}^{-1}$  and constant density of 240 *Daphnia*  $\text{L}^{-1}$  for the duration of the experiment by daily random removal of superabundant

*Daphnia* from the culture using a pipette. The crowding water from such a mass culture was first diluted with 0.45- $\mu\text{m}$  Millipore mesh-filtered conditioned lake water to obtain chemical information equivalent to *Daphnia* population densities of 60, 90, 120 and 240 ind.  $\text{L}^{-1}$  (density in the mass culture being twice that desired, no crowding water was added to media in the control treatment), and then each was mixed with an equal volume of medium containing food (*S. obliquus*) and fish kairomones (information on predation risk from aquaria containing 2+ roach), to give a food level of 1 mg C  $\text{L}^{-1}$ , a kairomone concentration of 0.125 fish  $\text{L}^{-1}$ , and information on *Daphnia* densities of 30, 60, 90 or 120 ind.  $\text{L}^{-1}$  in the inflow to the separate experimental chambers. This level of kairomones has previously been tested on many *Daphnia* clones and found to be very effective as information on predation risk (De Meester *et al.*, 1999). The control low population density animals received the same levels of food and kairomones, but the medium was mixed 1 : 1 with 0.45- $\mu\text{m}$  Millipore mesh-filtered conditioned lake water (without *Daphnia* information). For media free of information on predation risk, no kairomones were added to the low and high population density treatment water.

#### Experimental system

The same flow-through system was used for both the depth selection and growth assessment experiments (as used by Dawidowicz & Loose, 1992). This consisted of a set of 14, 28 or 49 glass flow-through tubular chambers (0.6 m long, 0.01 m internal diameter, 0.044 L volume) placed vertically in a transparent water bath that either ensured the same temperature (20 °C) throughout the water column (in growth assessments) or maintained thermal stratification within the chambers (depth-selection experiments), with 22 °C at the surface and 9 °C at the bottom, and a sharp (20–10 °C) thermocline between the depths of 0.25 and 0.40 m measured from the surface. Every chamber had an inflow at the top and an outflow at the bottom, with the latter covered by a 120- $\mu\text{m}$  mesh net to retain the animals inside. Fine black horizontal lines marked on the front of the water bath were used to determine the depth of each *Daphnia*. The medium was supplied to the chambers at a constant flow rate via a single multichannel peristaltic pump fed from 5-L glass reservoirs that were mixed by air bubbling. The system was illuminated from above using a set of four halogen lamps (20 W, 12 V) shining through a frosted glass diffuser, to produce an illumination gradient from 8.4  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the surface to 4.2  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at

the bottom, with a 12 : 12 L : D photoperiod. The media with chemical information on different population densities, with or without fish kairomones, were delivered to the flow-through chambers at the rate of 1.7  $\text{L d}^{-1}$  per chamber. A grid of 120 infrared light-emitting diodes placed behind the transparent water bath containing the flow-through chambers could be turned on at night to read the depth of each *Daphnia* in darkness using a sensitive military night vision device: Monocular MU3 (Bumar, Warsaw, PL).

#### Assessing individual growth rate and fecundity

Assessments were made on *Daphnia* grown in flow-through chambers with chemical information on population densities of 1 and 60 ind.  $\text{L}^{-1}$ , as the control and the treatment, respectively. At the start of each experiment, all synchronised 0- to 12-h-old neonates were transferred randomly to the plankton apparatus, at one individual per chamber. To determine initial size, 20 individuals were collected, examined under a dissecting microscope to measure body length (from the upper edge of the eye to the base of the tail spine), rinsed in distilled water, then dried overnight at 60 °C and weighed using a sensitive Orion-Cahn C-35 balance (Thermo Electron Corp., Beverly, MA, U.S.A.). The same procedure was applied to 5- to 7-day-old adults, with each animal being collected from the chamber within an hour of oviposition. This was achieved by hourly visits to collect all adults with freshly deposited eggs in the brood cavities, so that they were all at roughly the same physiological state when their final weights were taken. This collection period lasted up to 48 h as there was substantial variability in the time of first reproduction despite the genetic identity and the same age of all replicate *Daphnia*. This variation was possibly due to the well-known flexibility in the decision whether eggs should be deposited in the present or in the subsequent instar (Ebert, 1994). Before being dried and weighed, an image of each adult was saved as a MultiScan (Miami, FL, U.S.A.) frozen screen to permit estimation of the egg volume by measuring the two axes (length and diameter) of each ellipsoidal egg in the brood chamber.

The integrated volume of all eggs in the first clutch permitted calculation of the daily reproductive investment, as the ratio of clutch volume to age at first reproduction, thus giving the rate of resource allocation for reproduction in each individual, irrespective of the highly variable age of first reproduction. In total, three experiments (G1–G3) were completed on *D. hyalina*, all with a two-factorial design (Table 1).



**Table 1** Two-way ANOVA ( $F$  and  $P$ ) for significance of the effect of fish kairomones (FK), the effect of crowding information (density of 60 *Daphnia* L<sup>-1</sup>, CI) and the interaction between them (FK × CI) for different life history traits in growth experiments (the integrated data from three experiments G1–3). \*, \*\* and \*\*\* denote differences significant at  $P < 0.05$ ,  $P < 0.005$  and  $P < 0.0005$ , respectively. These statistics do not take into consideration individual body length, which is considered in Fig. 3 and Table 3

Factor or interaction	Growth rate	AFR	SFR	Egg volume	Clutch size	Daily reproductive investment
FK	58.7***	90.7***	186.0***	41.8***	29.4***	37.4***
CI	2.6 <sup>ns</sup>	0.1 <sup>ns</sup>	5.2*	0.3 <sup>ns</sup>	2.8 <sup>ns</sup>	2.6 <sup>ns</sup>
FK × CI	8.4**	5.6*	5.3*	6.0*	0.2 <sup>ns</sup>	0.6 <sup>ns</sup>

### Depth-selection experiments

Before being transferred to their individual flow-through plankton chambers, the synchronised 0- to 12-h-old *Daphnia* neonates were grown individually in batch cultures (each *Daphnia* in a 1 L glass jar) at high *Scenedesmus* food levels (1 mg C L<sup>-1</sup>) either in the absence (low-density control) or in the presence of crowding information (30–120 ind. L<sup>-1</sup>, high-density treatment). The 2-day-old juveniles were transferred to the flow-through chambers at one individual per chamber, and 6, 7 or 10 individuals per treatment, with a constant flow of medium as described above. The depth of each *Daphnia* was recorded every second hour during the 12 h of daylight, giving a total of seven observations per animal per day. A further five observations were made during the night using background infrared illumination and the military night vision device. A total of 13 experiments (D1–13) were completed, most in the presence of crowding information on 60 ind. L<sup>-1</sup> (D4–10), including one with additional night-time depth estimations (D9, Table 4). A two-factorial design was employed in preliminary experiments with the experimental and control treatments performed in both the presence and absence of fish kairomones. However, no difference in depth selection was ever detected in the absence of kairomones; hence, only one experiment (D13) of those presented had such a design to confirm the preliminary results (Table 4). Experiment D13 was performed with different levels of crowding information (30, 60, 90 and 120 ind. L<sup>-1</sup>).

### Testing vulnerability to fish predation

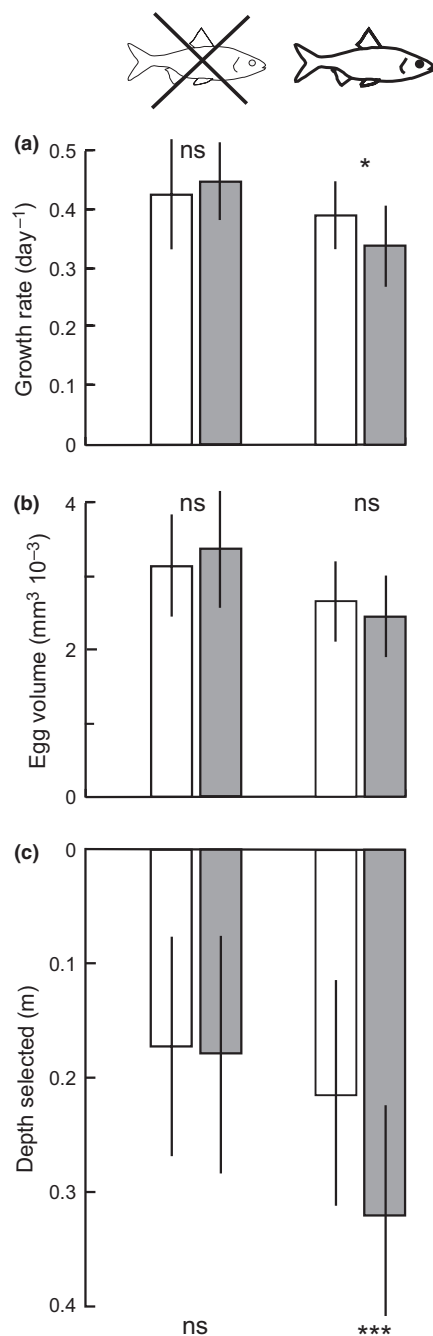
In each of three replicate experiments (performed in February, April and May 2009), 600 synchronised 0- to 8-h-old *Daphnia* neonates were grown separately for 5 days in 200 mL batch cultures, in medium with the same high *Scenedesmus* food level (1 mg C L<sup>-1</sup>) and the same concentration of fish kairomones (0.125 fish L<sup>-1</sup>), which were replaced daily. For half of the *Daphnia*, the medium also contained information on high population density

(60 *Daphnia* L<sup>-1</sup>), while for the other half this information was absent. After 5 days, all 300 individuals from each group were mixed together in 5 L of filtered water from Lake Gora. A few minutes later, each group was gently transferred to the surface layer of a column of 200 L of filtered lake water in separate 'plankton towers' consisting of identical vertical non-transparent plastic (PVC) tubes of 0.45 m diameter and 1.73 m depth, where the final *Daphnia* density was set at 1.5 ind. L<sup>-1</sup>. The day before, each column of water in these towers had been thermally stratified. The two towers, placed side by side, were illuminated from above with a 20-W lamp reflected from the white ceiling to produce an illumination gradient from 8  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the surface to 0.08  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  at the bottom of the water column - the subsurface illumination being well within the range suitable for roach predation activity (Gliwicz & Wrzosek, 2008). After a period of 20 min to permit acclimation and free distribution of the *Daphnia*, two 2-year-old roach of 60–70 mm body length, randomly selected from a stock tank, were added to each tower. These fish were allowed to feed for 30 min then removed, and the entire volume of 200 L of water from each tower was sieved through a 0.25-mm mesh plankton net. The retained *Daphnia* were counted to calculate the number harvested by the fish. This predation experiment was performed three times. The feeding duration of 30 min was selected after several preliminary experiments with durations of 20 and 60 min, which resulted in either too few *Daphnia* being eliminated by fish or left too few survivors to distinguish between treatments.

## Results

### Growth rate

The effect of fish kairomones was very strong and consistent, with the difference in growth rate being highly significant in each of the three experiments ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.0005$ ,  $P < 0.0005$ , respectively) and in the integrated data (FK in Table 1), both in the absence and in the presence of crowding information (Fig. 2a). This difference



**Fig. 2** Growth, per egg investment and depth-selection data for 4th and 5th instar *Daphnia* grown individually in the absence (empty bars) or in the presence (filled bars) of crowding information, and in the absence (no fish) or presence (fish) of fish kairomones (mean  $\pm$  1 SD): (a) daily body growth rate, and (b) per-offspring investment (egg volume) for 6- to 8-day-old *Daphnia* (each from pooled data from experiments G1-3, crowding information from a *Daphnia* density of 60 ind. L<sup>-1</sup>); (c) daytime depth selected by *Daphnia* throughout their growth in the flow-through system, from the 4-day-old juveniles to the 6-day-old females (data from experiment D13, crowding information from *Daphnia* densities of 120 ind. L<sup>-1</sup>, \* and \*\*\* denote difference significant at  $P < 0.05$  and  $P < 0.0005$ , respectively).

(nFK–FK) was found to be much greater in the presence (CI) than in the absence (nCI) of crowding information (Table 2), suggesting a strong interaction between the effects of the two factors.

The effect of crowding information was not found to be significant for the combined data from the two treatments (i.e. without and with the addition of kairomones; CI in Table 1), but the difference was significant for the data from the treatment with addition of kairomones (FK), where the growth rate was found to be reduced by 14% in the presence of crowding information (nCI–CI in Table 2, Fig. 2a).

The significant interaction between the effect of fish kairomones and the effect of crowding chemicals (FK  $\times$  CL) was consistent from one experiment to another (Table 1). Judging from the effect expressed as the % difference in growth rate in Table 2, we calculated that the synergistic effect of both factors – fish kairomones (FK) and crowding information (CI) – on growth rate (nFK–FK, CI) was much greater (28.2%) than the sum of the % reduction produced by kairomones alone (13.6%, nFK–FK, nCI) and by crowding information alone (–3.6%, nCI–CI, nFK) (i.e. merely a third of this value;  $13.6 - 3.6 = 10.0\%$ ).

### Reproduction

In contrast to the effects of fish kairomones on the rate of reproduction and life history parameters, the effect of crowding information was negligible and significant only for size at first reproduction (CI in Table 1). This was because of a very minor and non-significant difference between the treatments without and with crowding information (nCI–CI in Table 2). General ANOVA for the effect of fish kairomones on reproduction for the pooled data from these two treatments revealed that in the presence of kairomones, maturation was accelerated (lower AFR), body size at first reproduction reduced (smaller SFR), number of eggs per clutch reduced, and per-offspring investment diminished (smaller egg volume). All of these changes were very apparent in each of the three replicate experiments (at least at  $P < 0.05$ ) and in the entire data set (FK in Table 1). The effect of kairomones on each of the measured life history parameters (FK  $\times$  CI in Table 1) was magnified by crowding chemicals, indicating a strong interaction. The % reduction of each parameter caused by kairomones (nFK–FK) was greater in the presence (CI) than in the absence (nCI) of crowding information (Table 2).

The effect of kairomones on reproduction was more apparent when clutch size was related to *Daphnia* body

**Table 2** Two-way ANOVA for the effect of crowding information as a threat of starvation (CI) and the effect of fish kairomones as a threat of predation (FK) on the individual growth (growth rate), age (AFR) and size (SFR) at first reproduction, per-offspring investment (egg volume), number of eggs per clutch (clutch size), daytime depth selection (depth selected) and daily reproductive investment of *Daphnia* in the pooled data from all three experiments, given as the percentage difference (% diff) between the mean estimates (from all individuals in each treatment) in two-factorial experiments in the absence (nCI or nFK) or the presence (CI or FK) of information on another threat. This means that nFK–FK is the difference (in % of the higher value) between the treatments without and with fish kairomones, either in the absence (nCI) or in the presence of crowding information (CI), while nCI–CI is the difference (in % of the higher value) between the treatments without and with crowding information, either in the absence (nFK) or in the presence (FK) of fish kairomones. The significance of each difference for each trait from two-way ANOVA with post hoc Tukey's test is shown as \*, \*\* and \*\*\* for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.005$  and  $P < 0.0005$ , respectively

Diff	Treat	Growth rate	AFR	SFR	Egg volume	Clutch volume	Daily reproductive investment	Depth selected
		% diff $P$	% diff $P$	% diff $P$	% diff $P$	% diff $P$	% diff $P$	% diff $P$
nFK–FK	nCI	–13.6*	9.7***	13.0**	15.2*	–28.0*	42.0***	18.4*
	CI	–28.2***	17.4***	15.7***	31.2***	–31.5*	51.6***	44.1***
nCI–CI	nFK	–3.6 <sup>ns</sup>	–3.8 <sup>ns</sup>	–2.8*	–8.5 <sup>ns</sup>	–7.2 <sup>ns</sup>	8.2 <sup>ns</sup>	2.2 <sup>ns</sup>
	FK	14.0*	–5.0 <sup>ns</sup>	–0.3 <sup>ns</sup>	–11.9 <sup>ns</sup>	–11.7 <sup>ns</sup>	22.4 <sup>ns</sup>	32.9***

size (Fig. 3a,b, Table 3), which sheds light on how the life history parameters were related to each other. The effect of kairomones on clutch size was negligible in spite of the major shift in age (AFR) and size (SFR) at first reproduction. The ANCOVA testing the difference in elevation of the regression lines indicated that crowding information caused a decline in clutch size and daily reproductive investment in the presence and absence of kairomones (Fig. 3). Furthermore, in both the absence and presence of crowding chemicals, the number of eggs per clutch was greater in the presence of kairomones than in their absence (Table 3), possibly due to smaller egg size, as shown by the two-way ANOVA (egg volume in Table 1), further confirming the well-known effect of fish kairomones on *Daphnia* and their use of life history adjustments as an antipredation defence.

Crowding information also caused a reduction in the number of eggs per clutch (to the same extent in the absence and in the presence of fish kairomones), and a decline in daily reproductive investment (to a much higher extent in the presence of kairomones, nCI–CI in Table 3, Fig. 3). This resulted in a larger egg volume in the absence of kairomones (nCI–CI, nFK in Table 2) and a smaller egg volume in the presence of kairomones (nCI–CI, FK in Table 2). Neither of these two effects was significant, but their interaction was significant (egg volume for FK  $\times$  CI in Table 1).

### Depth selection

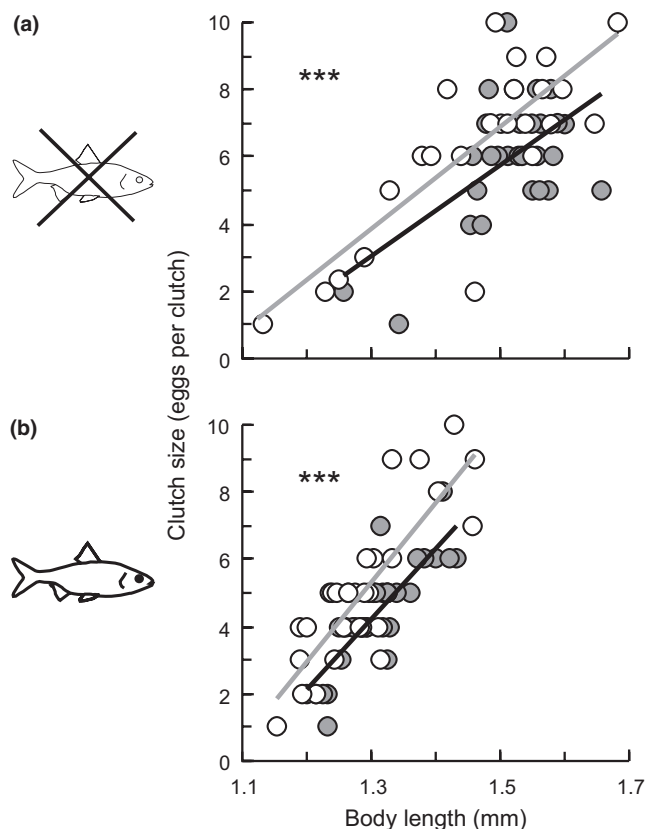
In preliminary studies, no difference in daytime depth in the presence or absence of information on high population density was ever detected in the absence of fish kairomones. Nor was a difference observed in the single two-

factorial experiment among the 13 depth-selection experiments conducted in this study, although the negative depressing effect of kairomones in the presence of crowding chemicals was as strong as expected from earlier kairomone studies (Fig. 2c, Table 2).

In spite of high variability in the results, the daytime depth was found to be greater in the presence than in the absence of crowding information tested in the presence of fish kairomones (in 6 of 13 experiments), particularly when this information was from densities of 60 or more *Daphnia* L<sup>–1</sup> and 4- to 7-day-old *Daphnia* were the test subjects (in 7 of 10 experiments, Table 4, Fig. 4). The depth difference increased with the intensity of the crowding information (Fig. 4b), with the slope of regression being non-significant for the lowest concentrations of this information (from 30 *Daphnia* L<sup>–1</sup>), significant for six of eight experiments with information from 30 *Daphnia* L<sup>–1</sup> and significant for all experiments with the two highest concentrations (90 and 120 ind. L<sup>–1</sup>) at  $P < 0.0004$  ( $F > 16.5$ , ANCOVA).

It was notable that the density required for the difference in depth selection to become evident was higher for younger and smaller *Daphnia* than for older and larger individuals. In the depth-selection experiments performed with the three density treatments of 30, 60 and >90 *Daphnia* L<sup>–1</sup>, this difference was significant in 33, 43 and 100% of experiments, respectively.

The depth selected in the presence of crowding information was often twice that selected in its absence. This difference vanished in the dark (Fig. 4a) and was not apparent for the earliest instars (i.e. individuals younger than 3 days; 72 h in Fig. 4b). When considering the entire data set (Table 4), this difference was also evident in the slope of the regression of the difference versus individual



**Fig. 3** Clutch size versus body length in 6- to 8-day-old 4th or 5th instar *Daphnia* grown individually in the absence (empty circles) or presence (filled circles) of crowding information from a *Daphnia* density of 60 ind.  $L^{-1}$ , in the absence (a) or in the presence (b) of fish kairomones (pooled data from experiments G1-3, statistics in Table 3, \*\*\* denote difference significant at  $P < 0.0005$ ). The elevations of regressions from the two treatments in the presence of crowding information (black lines) do not differ at  $P < 0.05$  (Table 3), but the clutch size was significantly greater in the absence than presence of kairomones ( $P < 0.0001$ ,  $F = 37.4$ , ANCOVA). This was also found for daily reproductive investment (nFK-FK for nCI and CI in Table 2), the data for which showed a similar distribution to those for clutch size.

age, which was significantly different from zero ( $P = 0.005$ ,  $F = 7.68$ , ANCOVA).

The single experiment (D13) examining a gradient of crowding information (0, 30, 60 and 120 *Daphnia*  $L^{-1}$ ) revealed no effect of crowding chemicals in the absence of fish kairomones (Fig. 5a): the slopes of neither the linear nor the log-transformed regression lines were different from 0 at  $P = 0.05$  (one-way ANOVA). However, the effect of crowding information was strong in the presence of kairomones, as revealed by the data integrated from the 13 experiments in Table 4 (Fig. 5b). There was a sharp increase in the difference in daytime depth in the absence and presence of crowding information during the initial phase of density increase from 0 up to 90 ind.  $L^{-1}$ . The

**Table 3** ANCOVA statistics for the effect of crowding information as a threat of starvation (CI) and the effect of fish kairomones as a threat of predation (FK) on the number of eggs per clutch (clutch size) and daily reproductive investment ( $mm^3 \cdot 10^{-3} \cdot day^{-1}$ ) of *Daphnia* in the pooled data from all three experiments (G1-3), given as the difference (Diff) between the mean (from all individuals in each treatment) estimates in two-factorial experiments in the absence (nCI or nFK) or in the presence (CI or FK) of information on another threat (as in Table 2, data on clutch size related to body length are presented in Fig. 3). The significance of the difference between the elevation of each regression (Fig. 3) for the pooled data is shown as \*, \*\* and \*\*\* for  $P < 0.05$ ,  $P < 0.005$  and  $P < 0.0005$ , respectively

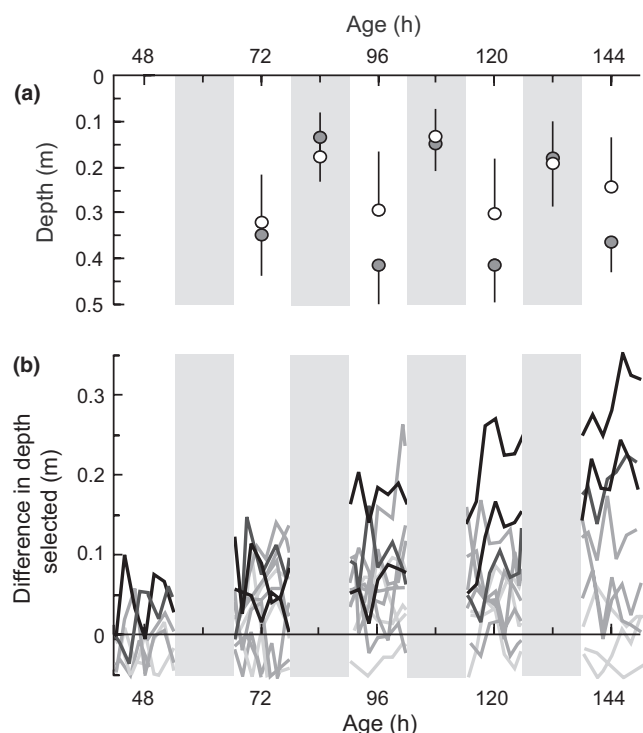
Exp	Diff	Treat	$n_{ind}$	Clutch size (egg per clutch)	Daily reproductive investment (mm <sup>3</sup> 10 <sup>-3</sup> day <sup>-1</sup> )
				$F$ and $P$	$F$ and $P$
nFK-FK		nCI	56	12.85**	7.36*
		CI	59	11.70**	0.26 <sup>ns</sup>
nCI-CI		nFK	52	12.63***	7.56**
		FK	63	15.25***	17.56***

**Table 4** The effect of crowding information on the daytime (and the night-time in D9) depth selection by *Daphnia* in each of the 13 experiments (Exp D1-D13), given as the difference (Diff) between the mean (from  $n_{ind}$  individuals, each assessed 10 times a day) daytime depth selected in the presence (filled circles in Fig. 4) or in the absence (empty circles in Fig. 4) of this information for densities (ind.  $L^{-1}$ ) of 30, 60, 90 and 120 *Daphnia*  $L^{-1}$  of 1- to 2-day-old (18–54 h) and 3- to 7-day-old (66–150 h) *Daphnia*, all in the presence of fish kairomones, except D13 (a two-factorial experiment). The significance of the difference is shown for each experiment as  $P$  at a given value of  $F$  (repeated measures ANOVA); \*, \*\* and \*\*\* denote difference significant at  $P < 0.05$ ,  $P < 0.005$  and  $P < 0.0005$ , respectively

Exp	ind. $L^{-1}$	$n_{ind}$	40–150 h		90–150 h	
			Diff	$F$ and $P$	Diff	$F$ and $P$
D1	30	7	−0.01	5.43 <sup>ns</sup>	−0.02	5.43 <sup>ns</sup>
D2	30	6	−0.04	7.19*	−0.04	12.32**
D3	30	6	−0.01	0.94 <sup>ns</sup>	−0.01	0.08 <sup>ns</sup>
D4	60	10	−0.00	0.01 <sup>ns</sup>	−0.02	0.50 <sup>ns</sup>
D5	60	10	−0.02	0.84 <sup>ns</sup>	−0.02	0.25 <sup>ns</sup>
D6	60	10	−0.05	11.94**	−0.07	19.15***
D7	60	10	−0.04	2.96 <sup>ns</sup>	−0.07	6.37*
D8	60	7	−0.04	3.24 <sup>ns</sup>	−0.05	5.77*
D9	60	6	−0.10	48.68***	−0.11	51.66***
D9*	60	6	−0.01	0.02 <sup>ns</sup>	−0.01	0.02 <sup>ns</sup>
D10	60	6	−0.02	0.32 <sup>ns</sup>	−0.03	1.67 <sup>ns</sup>
D11	90	6	−0.11	23.70***	−0.12	27.06***
D12	120	7	−0.08	9.15*	−0.10	10.17**
D13†	120	6	−0.08	7.35*	−0.08	8.84*

\*Night-time data.

†A two-factorial experiment that was performed at the beginning of this study whose results suggested the abandonment of treatments without fish kairomones. This suggestion also emerged from other two-factorial experiments performed with other *Daphnia* species (unpublished data).

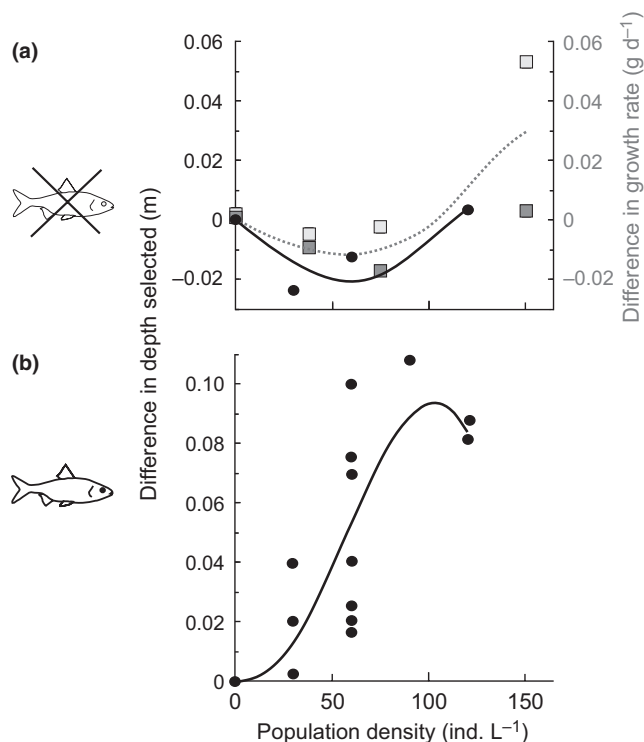


**Fig. 4** Depth selection of individual *Daphnia* in the presence of fish kairomones, in the absence or presence of crowding information throughout their growth in the flow-through system, from 2-day-old juveniles (48 h) to 6-day-old females (144 h): (a) an example of mean ( $\pm 1$  SD) daytime (unshaded) and night-time (shaded background) depth selected by individual *Daphnia* in the absence (empty circles) or presence (filled circles) of crowding information from a *Daphnia* density of 120 ind.  $L^{-1}$  (six individuals  $\times$  4 days  $\times$  7 daytime + four night-time assessments per day in each of the two treatments, the difference significant at  $P < 0.0005$ , experiment D9, statistics in Table 4); (b) ontogenetic evolution of the difference in daytime depth between treatments without or with crowding information on population densities of 30, 60, 90 and 120 ind.  $L^{-1}$  (respectively, from light- to dark-shaded lines, each depicting daytime change in mean difference in depth selected by six individuals in experiments D1–D13, statistics in Table 4).

slope of the regression was different from zero ( $F = 3.45$ ,  $P < 0.0369$ , ANCOVA).

#### Vulnerability to fish predation

All three experiments in which 300 *D. hyalina* were subjected to 30 min of predation by roach revealed a highly reproducible difference in the proportion of *Daphnia* consumed between those grown in the presence and in the absence of information on high population density, when they were offered to fish at the same density level. In spite of the variability in the outcome of the three experiments (Fig. 6), the percentages of *Daphnia* eliminated when grown in the presence and in the absence of information on high density were significantly different in



**Fig. 5** The difference in daytime depth selected by individual *Daphnia* in the absence or presence of crowding information from *Daphnia* densities of 30, 60, 90 and 120 ind.  $L^{-1}$ , each in the absence (a) or presence (b) of fish kairomones (filled circles and black lines) from all 13 experiments listed in Table 4. Data extracted from fig. 2 in Burns (1995) on the difference in birth rate in *Daphnia* in the absence or presence of crowding information from different densities and in the absence of kairomones were added to panel (a) as squares for *Daphnia hyalina* and *Daphnia galeata* (dark and light shaded, respectively). Points represent observations; lines are the best fits selected by Excel Plot as multinomial type curves.

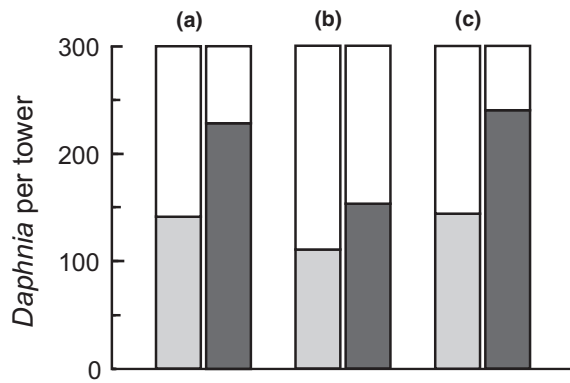
each case (24 and 53%, 49 and 63%, and 20 and 52% in the 1st, 2nd and 3rd experiments, respectively). The differences seen in the three experiments (14, 29 and 32%, respectively) were all significant at  $P \leq 0.05$  according to the Kruskal–Wallis test, but slightly outside the margins of significance using Wilcoxon's test ( $P = 0.08$ ). The number of survivors was always more than 1.5-fold greater in *Daphnia* grown in the presence of information on high population density.

#### Discussion

##### A rift between crowding and kairomone studies

Since the earliest studies on *Daphnia* demography, competition, life history and behaviour, examinations of the effects of high-density chemical information and of fish kairomones have often been completely separated from each other. This is in spite of the fact that each is equally





**Fig. 6** Vulnerability to fish predation of 5-day-old *Daphnia* grown to the 4th instar in the absence (light shaded) or presence (dark shaded) of information on high population density levels. This vulnerability was assessed in each of three replicate experiments in February (a), April (b) and May (c) 2009 as the number of individuals surviving 30 min of predation by roach. Both towers were inoculated with 300 *Daphnia*, 15 min before the fish (two 2-year-old roach) were added, to produce an initial density of 1.5 ind. L<sup>-1</sup>.

important to both components of *Daphnia* fitness: reproduction and mortality.

Since the initial studies of Frank (1952, 1957), investigations of the effects of high population density have remained focussed on food limitation, resource competition and declines in the rates of ingestion, individual body growth, fecundity and population increase (Ban *et al.*, 2008 and many other papers cited there), while ignoring the likely effect on *Daphnia* vulnerability to predation that may change with population density. The authors' reasoning has been dominated by the density-dependent effects of resource competition (Fig. 1a), with little attention paid to density-dependent predation risk (Fig. 1b). Moreover, they have generally examined the effects of crowding information from *Daphnia* cultures at densities exceeding the half-saturation density levels ( $\frac{1}{2}K$  in Fig. 1) that are typical of fishless habitats, rather than those with fish where predation does not permit high densities to persist except for the short period of the spring clear water phase (Lampert, 1988; Gliwicz & Wrzosek, 2008).

On the other hand, studies on the effects of kairomones, since those of Dodson (1989), Machaček (1991), Stibor (1992), Pijanowska, Weider & Lampert (1993) and Pijanowska (1994), have concentrated on predation risk, death rates and antipredation morphological, life history and behavioural defences, while ignoring the likely effects of crowding information on feeding, growth and reproduction, as is evident from the review by Tollrian & Harvell (1999). Their approach, focussed on predation risk and antipredation defences, has often ignored the density-dependent effects of resource competition (Fig. 1a). These

authors appear to have been reluctant to check whether the costly defences are displayed at low population densities, with most experiments being performed at high densities, most likely above half-saturation density levels ( $\frac{1}{2}K$  in Fig. 1) where it was possible to show that a *Daphnia* or *Bosmina* aggregation offers safety in the swarm, albeit in exchange for the costs of reduced feeding and growth owing to low food levels (Jakobsen & Johnsen, 1987, 1988; Pijanowska, 1994). This approach exploited the importance of a 'high-density antipredation refuge' that may occur when density increases beyond the point of half-saturation ( $\frac{1}{2}K$  in Fig. 1b) and ignored the possibility of an antipredation refuge produced by extremely low densities, when individual risk becomes reduced nearly to zero, a situation that is often observed in lakes with fish as 'summer *Daphnia* declines' (Sommer *et al.*, 1986).

It seems that recent reports have not contributed significantly to closing this rift, even though the possible interaction between the effects of information on increased risk and the effects of food stress (that may result from crowding) has been previously suggested (Pauwels, Stoks & De Meester, 2010).

#### *Dual nature of crowding information in the presence of predation threat*

The results of our two-factorial experiment did not confirm the notion that information on high *Daphnia* density should instigate declines in the rate of individual body growth. However, significant effects of crowding information alone were detected in some of the life history parameters (SFR) and the rate of reproduction represented as either clutch size or daily reproductive investment, substantiating the common belief that crowding chemicals carry information on impending food stress and the need to increase per-offspring investment (Glazier, 1992; Burns, 1995). These effects were not detected in depth selection. The absence of a major effect on growth rate could stem from the much lower *Daphnia* densities used in our study than those employed by Seitz (1984), Lee & Ban (1999), Burns (1995, 2000) and Rose *et al.* (2002). The density of 60 *Daphnia* L<sup>-1</sup> used in our growth experiments was most likely below the half-saturation density level and certainly far below the carrying capacity ( $\frac{1}{2}K$  and  $K$  in Fig. 1) of *D. hyalina*, estimated to be 100–200 ind. L<sup>-1</sup> in highly productive systems (Gliwicz, 2003; Gliwicz & Wrzosek, 2008), and representing the range of densities commonly used in earlier studies of crowding effects.

The effects of fish kairomones in our study were found to be as strong as in previous kairomone studies (see review by Tollrian & Harvell, 1999). They were stronger

than the effects of crowding information and apparent in growth rate, AFR, SFR, egg volume, clutch size and also depth selection. The effects of kairomones were opposite to those of crowding information in SFR, clutch size and daily reproductive investment: in their presence, *Daphnia* selected greater depths, their growth rates were reduced, and reproduction occurred earlier at smaller body sizes and produced a greater number of eggs of smaller size.

Our study revealed a strong interaction between the effects of kairomones and of crowding information that was most apparent when examined as the difference in the effect of kairomones in the absence and presence of crowding chemicals. This interaction stemmed from the additive effects of kairomones and crowding information on growth rates and depth selection, and from their opposing effects on SFR, clutch size, egg volume and daily reproductive investment.

The effect of kairomones on egg volume was much stronger in the presence than in the absence of crowding information that may signal impending food shortage, because *Daphnia* was either (i) unable to increase per-offspring investment because of its smaller body size and brood cavity at earlier first reproduction or (ii) reluctant to produce larger offspring that would be more vulnerable to visual predation.

This interaction was most spectacular in depth selection: the daytime depth selected by *Daphnia* in the presence of kairomones was much greater in the presence than the absence of crowding chemicals. The % difference between the depths selected in the absence and presence of kairomones was twofold greater in the presence of crowding information and was further increased with the increasing body size of subsequent instars, particularly when the intensity of the crowding information was greater.

These observations suggest that crowding information, apart from representing a cue indicating impending food stress and the need to increase per-offspring investment, carries a signal of increased risk of predation and the need to invest more in antipredation. The effect of this signal is most apparent in depth selection, one of the most flexible and most rapid antipredation defences, a behavioural adjustment to predation risk that may be less costly and swifter than alternate life history antipredation strategies such as diapause or other changes induced in life history traits (Tollrian & Harvell, 1999).

#### *Two explanations why the response to fish kairomones is stronger at higher density level*

The first possible explanation for the stronger response of *Daphnia* at high-density levels to fish kairomones may be

adopted from the reasoning given by Pauwels *et al.* (2010), who suggested that under food stress (which is often a consequence of high population density), investments in growth, reproduction and further population increase are no longer adaptive, so *Daphnia* should reallocate resources and invest more in survival (i.e. replace a strategy to maximise reproduction with one to minimise mortality rate). Such reasoning could also be applied to explain the findings of the present study. When information on crowding indicates approaching food stress, the presence of fish kairomones should cause *Daphnia* to reduce their investment in growth and reproduction in an attempt to strengthen their antipredation chances and remain alive for as long as possible, until food availability and safety improve, perhaps also by selecting greater depths where lower temperature should permit increased longevity, as suggested by Dawidowicz & Loose (1992) and De Meester *et al.* (1999).

The second possible explanation arises from the notion of 'low-density antipredation refuge' (Fig. 1b). Below a threshold population density, optimally foraging harvesters such as planktivorous fish either switch to alternate prey categories or migrate away in search of more profitable locations with higher densities of prey (Gliwicz & Wrzosek, 2008). Therefore, at low population densities, *Daphnia* should suppress costly antipredation defences and reallocate resources to growth and reproduction. This reasoning could also provide another possible explanation for the findings of Pauwels *et al.* (2010). When information on high food abundance indicates low population density, the presence of fish kairomones as a warning of increased risk should be ignored by *Daphnia*, and resources reallocated into increased growth and reproduction or into the production of diapausing eggs when forthcoming starvation is expected (Ferrari & Hebert, 1982; Slusarczyk, 2001; Fitzsimmons & Innes, 2006).

While the second explanation reflects the role of information on high population density in reinforcing antipredation in the presence of kairomones, the first, following the arguments of Pauwels *et al.* (2010), takes account of the effects of kairomones in the reaction to anticipated food stress (resulting from crowding). In spite of their different approaches, the present study and that of Pauwels *et al.* (2010) have a similar message: that the defensive reaction of *Daphnia* to fish kairomones is stronger under high than low population density conditions (and at low rather than high food levels). However, it is not clear which of the two possible scenarios (high density as a signal of impending food stress or increased predation risk) is more likely and whether the two are mutually exclusive or additive to each other.

In interpreting our findings, the notion of 'low-density refuge' seemed to be an equally attractive alternative. Discarding defences allows more energy to be allocated to growth and reproduction at low population densities when predators remain attracted to alternate prey categories or to more prey-proficient sites. This view is supported by the fact that most of the effects of crowding information, at the intensities used in our study, were too small to be detected in the absence of kairomones but very apparent in their presence (Table 1); the difference between the treatments without and with fish kairomones in the presence of crowding information was twice that in its absence. This notion was further supported by the results of the fish predation trials, which revealed that acclimation of *Daphnia* to the risk of predation when grown in the presence of fish kairomones allowed them to respond more rapidly to imposed predation with an enhanced ability to evade the experimental fish. This could stem from their higher sensitivity to light and their more rapid evasion by descent to greater depth in 'plankton towers'. This possibly represents the quickest behavioural defence that does not require any experience from earlier encounters with the predator.

However, there are three reasons for a general reluctance to accept the 'low-density-refuge' explanation. The first lies in the different ranges within the population density spectrum that represent each of the two approaches; the densities of the maximum individual risk that are right between the two density ranges (Fig. 1b) are often regarded as a low-density situation when compared to that within a dense aggregation. The second lies in the different ways of looking at the inducible defences of zooplankton, focussing on either the ability to switch them on, as in the reviews of Dodson (1989) and Tollrian & Harvell (1999), or the ability to suppress them when they are not needed, in an effort to reallocate resources to growth and reproduction, as shown in this study. The third lies in the different ways of looking at a *Daphnia* aggregation: either as a refuge from fish predation (Milinski & Heller, 1978; Jakobsen & Johnsen, 1988; Pijanowska, 1994) or as a site of highly efficient feeding for planktivorous fish exploiting patches of prey (McNaught & Hasler, 1961; Jackson *et al.*, 2005; Ioannou *et al.*, 2009).

The two explanations of enhanced *Daphnia* growth at low population density do not have to be considered as strict alternatives. Whatever the subject of the 'forewarning' conveyed by high population density (impending starvation or increased predation), the need to invest in survival goes side by side with the need to invest in defences, the latter being a component of the former. It is

possible that crowding information carries not only a cue indicating approaching food stress (as known from earlier studies), but also signals the need to activate defences. Activating antipredation defences at high density may reflect a life history shift from maximising birth rate (non-adaptive in cases of approaching food shortage) to minimising death rate (as suggested by Pauwels *et al.*, 2010). Suppressing defences at low-density levels may reflect a shift from investing in behavioural and life history defences to investment in faster growth and increased reproduction, while taking advantage of a time window when the 'low-density antipredation refuge' can be exploited (as suggested in this study). The phenomenon of discarding defences in the absence of crowding information seems highly adaptive, regardless of whether it is a response to the perception of approaching food abundance or the reduced risk of predation, or both.

### Acknowledgments

We thank A. Hankiewicz for assistance with the experimental work, J. Wisnioch for allowing us to use a prototype of the Monocular MU3 military night vision device, P. Bentkowski for his assistance in constructing the system of infrared light-emitting diodes for night observations, as well as L. De Meester, P. Dawidowicz, S. Sarma, S. Nandini, C. Cáceres, J.R. Gittins and two anonymous referees for valuable comments on earlier drafts of this manuscript. This research was supported by grants from the State Committee for Scientific Research, Poland, 6P04F01921 and 2P04G01430 to Z.M. Gliwicz, 0647/P01/2007/32 to B. Pietrzak, and 0673/B/P01/2009/36 to P. Maszczyk.

### References

- Ban S., Ohnishi T., Mori T. & Lee H.W. (2008) Is the negative effect of crowding on ingestion rate in *Daphnia pulex* induced physically or chemically? *Limnology*, **9**, 13–18.
- Boersma M. (1999) Environmental stress and local adaptation in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, **44**, 393–402.
- Burns C.W. (1995) Effects of crowding and different food levels on growth and reproductive investment of *Daphnia*. *Oecologia*, **101**, 234–244.
- Burns C.W. (2000) Crowding-induced changes in growth, reproduction and morphology of *Daphnia*. *Freshwater Biology*, **43**, 19–29.
- Dawidowicz P. & Loose C.J. (1992) Metabolic costs during predator-induced diel vertical migration of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, **37**, 1589–1595.
- De Meester L., Dawidowicz P., Van Gool E. & Loose C.J. (1999) Ecology and evolution of predator-induced behavior



- of zooplankton: depth selection behavior and diel vertical migration. In: *The Ecology and Evolution of Inducible Defences* (Eds R. Tollrian & C.D. Harvel), pp. 160–176. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Dodson S.I. (1989) Predator-induced reaction norms. *BioScience*, **39**, 447–452.
- Ebert D. (1994) A maturation size threshold and phenotypic plasticity of age and size at maturity in *Daphnia magna*. *Oikos*, **69**, 309–317.
- Ferrari D. & Hebert P. (1982) The induction of sexual reproduction in *Daphnia magna*: genetic differences between arctic and temperate populations. *Canadian Journal of Zoology*, **60**, 2143–2148.
- Fitzsimmons J.M. & Innes D.J. (2006) Inter-genotype variation in reproductive response to crowding among *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia*, **568**, 187–205.
- Folt C.L. & Goldman C.R. (1981) Allelopathy between zooplankton: a mechanism for interference competition. *Science*, **213**, 1133–1135.
- Frank P.W. (1952) A laboratory study of intraspecies and interspecies competition in *Daphnia pulicaria* (Forbes) and *Simocephalus vetulus* O.F. Müller. *Physiological Zoology*, **25**, 173–204.
- Frank P.W. (1957) Coactions in laboratory populations of two species of *Daphnia*. *Ecology*, **38**, 510–519.
- Glazier D.S. (1992) Effects of food, genotype, and maternal size and age on offspring investment in *Daphnia magna*. *Ecology*, **73**, 910–926.
- Gliwicz Z.M. (2003) *Between Hazards of Starvation and Risk of Predation: The Ecology of Offshore Animals*. International Ecology Institute, Oldendorf/Luhe.
- Gliwicz Z.M., Dawidowicz P. & Maszczyk P. (2006) Low-density anti-predation refuge in *Daphnia* and *Chaoborus*? *Archiv für Hydrobiologie*, **167**, 101–114.
- Gliwicz Z.M., Szymanska E. & Wrzosek D. (2010) Body size distribution in *Daphnia* populations as an effect of prey selectivity by planktivorous fish. *Hydrobiologia*, **643**, 5–19.
- Gliwicz Z.M. & Wrzosek D. (2008) Predation-mediated coexistence of large- and small-bodied *Daphnia* at different food levels. *American Naturalist*, **172**, 358–374.
- Hamilton W.D. (1971) Geometry for the selfish herd. *Journal of Theoretical Biology*, **31**, 295–311.
- Hayward R.S. & Gallup D.N. (1976) Feeding, filtering and assimilation in *Daphnia schoedleri* Sars as affected by environmental conditions. *Archiv für Hydrobiologie*, **77**, 139–163.
- Helgen J.C. (1987) Feeding rate inhibition in crowded *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia*, **154**, 113–119.
- Hines A.H., Whitlatch R.B., Thrush S.F., Hewitt J.E., Cummings V.J., Dayton P.K. *et al.* (1997) Nonlinear foraging response of a large marine predator to benthic prey: eagle ray pits and bivalves in a New Zealand sandflat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **216**, 191–210.
- Holling C.S. (1959) Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Canadian Entomology*, **91**, 385–398.
- Ioannou C.C., Morrell L.J., Ruxton G.D. & Krause J. (2009) The effect of prey density on predators: conspicuousness and attack success are sensitive to spatial scale. *American Naturalist*, **173**, 499–506.
- Jackson A.L., Brown S., Sherratt T.N. & Ruxton G.D. (2005) The effects of group size, shape and composition on ease of detection of cryptic prey. *Behaviour*, **142**, 811–826.
- Jakobsen P.J. & Johnsen G.H. (1987) The influence of predation on horizontal distribution of zooplankton species. *Freshwater Biology*, **17**, 501–507.
- Jakobsen P.J. & Johnsen G.H. (1988) Size-specific protection against predation by fish in swarming waterfleas *Bosmina longispina*. *Animal Behaviour*, **36**, 986–990.
- Kuhlman M.L. & Hines A.H. (2005) Density-dependent predation by blue crabs *Callinectes sapidus* on natural prey populations of infaunal bivalves. *Marine Ecology Progress Series*, **295**, 215–228.
- Laforsch Ch., Beccara L. & Tollrian L. (2006) Inducible defences: the relevance of chemical alarm cues in *Daphnia*. *Limnology & Oceanography*, **51**, 1466–1472.
- Lampert W. (1988) The relationship between zooplankton biomass and grazing. A review. *Limnologica*, **19**, 11–20.
- Lee H.-W. & Ban S. (1999) Effect of crowding on growth and reproduction of *Simocephalus vetulus* O.F. Müller. *Hydrobiologia*, **391**, 135–145.
- Lipcius R.N. & Hines A.H. (1986) Variable functional responses of a marine predator in dissimilar homogeneous microhabitats. *Ecology*, **67**, 1361–1371.
- Lüring M., Roozen F., van Donk E. & Goser B. (2003) Response of *Daphnia* to substances released from crowded congeners and conspecifics. *Journal of Plankton Research*, **25**, 967–978.
- Machaček J. (1991) Indirect effects of planktivorous fish on the growth and reproduction of *Daphnia galeata*. *Hydrobiologia*, **225**, 193–197.
- Matveev V.F. (1993) An investigation of allelopathic effects of *Daphnia*. *Freshwater Biology*, **29**, 99–105.
- McNaught D.C. & Hasler A.D. (1961) Surface schooling and feeding behavior in the white bass, *Roccus chrysops* (Rafinisque), in Lake Mendota. *Limnology and Oceanography*, **6**, 53–60.
- Milinski M. & Heller R. (1978) Influence of a predator on the optimal foraging behaviour of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Nature*, **275**, 642–644.
- Pauwels K., Stoks R. & De Meester L. (2010) Enhanced anti-predator defence in the presence of food stress in the water flea *Daphnia magna*. *Functional Ecology*, **24**, 322–329.
- Pijanowska J. (1994) Fish-enhanced patchiness in *Daphnia* distribution. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie Verhandlungen*, **25**, 2366–2368.
- Pijanowska J. (1997) Alarm signals in *Daphnia*? *Oecologia*, **112**, 12–16.

- Pijanowska J., Weider L.W. & Lampert W. (1993) Predator-mediated genotypic shifts in a prey population: experimental evidence. *Oecologia*, **96**, 40–42.
- Rose R.M., Warne M.S.J. & Lim R.P. (2002) Some life history responses of the cladoceran *Ceriodaphnia* cf. *dubia* to variations in population density at two different food concentrations. *Hydrobiologia*, **427**, 59–64.
- Rosenzweig M.L. & MacArthur R.H. (1963) Graphical representation and stability conditions of predator-prey interactions. *American Naturalist*, **47**, 209–223.
- Seitz A. (1984) Are there allelopathic interactions in zooplankton? Laboratory experiments with *Daphnia* *Oecologia*, **62**, 94–96.
- Seitz R.D., Lipcius R.N., Hines A.H. & Eggleston D.B. (2001) Density-dependent predation, habitat variation, and the persistence of marine bivalve prey. *Ecology*, **82**, 2435–2451.
- Slusarczyk M. (2001) Food threshold for diapause in *Daphnia* under the threat of fish predation. *Ecology*, **82**, 1089–1096.
- Sommer U., Gliwicz Z.M., Lampert W. & Duncan A. (1986) The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Archiv für Hydrobiologie*, **106**, 433–471.
- Stibor H. (1992) Predator-induced life-history shifts in a freshwater cladoceran. *Oecologia*, **92**, 162–165.
- Tollrian R. & Harvell C.D., Eds (1999) *The Ecology and Evolution of Inducible Defences*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Young S., Watt P.J., Grover J.P. & Thomas D. (1994) The unselfish swarm? *Journal of Animal Ecology*, **63**, 611–618.

(Manuscript accepted 1 March 2012)

## **VI.5. Załącznik 5**

Maszczyk P. i Bartosiewicz, M. 2012 – Threat of treat: the role of fish exudate in the growth and life history of *Daphnia* – Ecosphere. 3 (10): 1–19.

## Threat or treat: the role of fish exudates in the growth and life history of *Daphnia*

PIOTR MASZCZYK<sup>1,†</sup> AND MACIEJ BARTOSIEWICZ<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Hydrobiology, University of Warsaw, Banacha 2, 02-097 Warszawa, Poland

**Citation:** Maszczyk, P., and M. Bartosiewicz. 2012. Threat or treat: the role of fish exudates in the growth and life history of *Daphnia*. *Ecosphere* 3(10):91. <http://dx.doi.org/10.1890/ES12-00146.1>

**Abstract.** In kairomone studies, it is often implicitly assumed that the only effect of predator exudates on their prey is to trigger anti-predator defenses. However, chemicals originating from fish activity may also fertilize the environment and enhance the growth of zooplankton prey by increasing bacterial food availability. It is necessary to separate these two effects in order to examine the adaptive significance of zooplankton anti-predation defenses and the ability of the prey to benefit from fish-related food.

Here, we have employed differential filtration of media to permit assessment of these two effects on growth rate and life history adjustments in two *Daphnia* species that differ in body size and the ability to collect small particles (greater in small-bodied *D. cucullata* than in larger *D. hyalina*). Filters of three mesh sizes were employed: 2  $\mu\text{m}$  (most bacteria pass, but detritus is retained), 0.45  $\mu\text{m}$  (standard) and 0.20  $\mu\text{m}$  (most bacteria and detritus retained).

The concentration of kairomones in the fish medium was assumed to be unaffected by filtration. However, the abundance of bacteria in the fish and no-fish media was dependent on the filter mesh size. This influenced the food level and its impact on *Daphnia* growth rate and life history. The effect of fish-related bacterial food was greater under low than under high algal food conditions (0.1 and 1.0 mg C/L) and more significant in *D. cucullata*.

Use of media with a diminished bacterial abundance revealed the effect of kairomones alone as (1) reduced growth rate, size at reproduction, number of pre-adult instars, age at maturation, level of the integrated egg and body lipids, egg volume, and (2) increased number of eggs per clutch vs. body length. These effects were equally strong in both species, despite differences in body size, and were greater at the higher algal food concentration. The findings of this study indicate the need to re-analyze and possibly revise the results of previous kairomone studies, especially those using media filtered through mesh sizes coarser than 0.2  $\mu\text{m}$  that were performed under limiting algal food conditions or with species particularly able to benefit from bacterial food.

**Key words:** bacterial food; filter mesh size; food limitation; growth rate; kairomones; life history.

**Received** 18 May 2012; revised 7 September 2012; accepted 13 September 2012; **published** 30 October 2012. Corresponding Editor: J. Benstead.

**Copyright:** © 2012 Maszczyk and Bartosiewicz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits restricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and sources are credited.

<sup>2</sup> Present address: Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau, Terre et Environnement, Quebec, Quebec Canada G1K 9A9.

† **E-mail:** fizbanek@wp.pl

### INTRODUCTION

The common occurrence of chemical communication in aquatic ecosystems stems from the

persistence of infochemical gradients in media of high viscosity, such as water, when compared with the turbulent atmosphere (Pohnert et al. 2007). In lake water, where the reliability of

visual cues can be obscured either by high turbidity or low ambient light intensities (Vinyard and O'Brien 1976), chemical communication is a suitable and effective way of acquiring information about the environment (Havel 1987, Tollrian and Harvell 1999). Among known infochemicals, kairomones have received much attention over the last 25 years as a result of studies on inducible reactions in animals. Kairomones are semiochemicals (chemical signals that transmit information between individuals; Law and Regnier 1971) mediating interspecific interactions that benefit the receiver rather than the emitter (Brown et al. 1970). While the majority of studies on kairomones in terrestrial habitats concern substances used by foraging organisms to locate the emitter as a possible food source ('foraging kairomones', Kats and Dill 1998), in aquatic systems, the focus is more on kairomones as signals warning of the risk of predation (Larsson and Dodson 1993). The ability of a potential prey to detect such predator-related kairomones (Ruther et al. 2002) and phenotypically adjust aspects of its life history, morphology and behavior may result in better predator avoidance or predator resistance (Havel 1987, Larsson and Dodson 1993, Tollrian and Harvell 1999).

Predator-released compounds not only carry important information on the current risk of predation, they may also indirectly (e.g., nutrients released by herbivorous zooplankton for algae and bacteria) or directly (nutrients released by vertebrate and invertebrate predators for herbivores) represent a source of high-quality food that may enhance the growth and fecundity of the prey. Therefore, to appreciate the full ecological significance of kairomone-induced anti-predation defenses it is vital to separate the different effects of these factors on prey species. This is a challenging task while the chemical nature of kairomones remains unknown. To date, only a few infochemical cues have been characterized and can be applied to experimental systems as pure substances (Kusch and Heckmann 1992, Yasumoto et al. 2005). In many cases, difficulties have been encountered when attempts have been made to recognize the source and chemical (or biochemical) nature of kairomones (Burks and Lodge 2002, Pohnert et al. 2007). Therefore, rather than by adding the pure

substance, most experimental work on kairomone-inducible defenses has been carried out using media based on filtered lake water in which the predator or injured conspecifics were once present (e.g., Macháček 1991, Stibor 1992, Stibor and Luning 1994). Although this approach has considerable limitations, it is now well established in ecological and evolutionary research and has been employed in numerous studies on prey-predator interactions in freshwaters, most examining the relationship between planktonic animals and planktivorous fish (Larsson and Dodson 1993, Lass and Spaak 2003).

It is clear that some bacteria remain even in thoroughly filtered lake water. Moreover, the bacterial biomass in experimental media increases over the course of an experiment and bacterial growth is stimulated by the increased nutrient concentrations resulting from the presence of a predator or injured prey before media preparation. For this reason, accurate determination of the overall effect of kairomones and alarm substances is difficult (easily under- or overestimated) even under 'controlled' laboratory conditions. The presence of readily digestible surplus predator-related food can lead to significant underestimation of the growth reducing force of kairomones in otherwise well constrained planktonic herbivore life history experiments. Overestimation of the effects of kairomones may be observed in studies on the depth selection of *Artemia* and *Daphnia* (Forward and Rittschof 1999, Ringelberg and Van Gool 1998, respectively), where animals occupy the deeper layers of the water column in the presence of fish exudates and feces, partly due to the decreased threat of predation (Dodson 1988), but possibly also because relatively higher concentrations of bacterial food are present in the deeper strata.

Overestimation of the effect of kairomones may also result from the stronger reaction to these infochemicals at higher food levels (Lima and Dill 1990). Since satiated animals are able to expend more energy on risk avoidance, they are more likely to accept later maturation in the deep, dark and cold hypolimnion (Hays et al. 2001), or a slower growth rate due to life history adjustments (Gliwicz and Maszczyk 2007). A good example of possible exaggeration of the effect of kairomones is provided by the ciliate *Euplotes octocarinatus*, which exhibits morpholog-



ical defences in response to predator cues released by another ciliate *Stylonychia mytilus*, but only at high food levels (Wiackowski and Szkarlat 1996). Such overestimation might also have been observed in studies on the freshwater bacterium *Sphingobium* that forms aggregates when exposed to predation by a protistan (*Poteroiochromonas* sp.), a response that is probably not only due to the presence of specific chemical cues (Pernthaler et al. 1997, Blom et al. 2010), but may likewise be caused by surplus substrates and nutrients released by the predator into the surrounding medium (Blom et al. 2010). This may also apply to algae that form grazing-resistant colonies in the presence of the herbivorous *Daphnia* and rotifers (Hessen and Van Donk 1993). The overestimation of the effect of kairomones might be attributed to a variety of other behavioral and phenotypic responses to 'predator medium', such as horizontal migration, and spine or helmet induction in rotifers, ciliates and cladocerans (Gilbert 1966, Kuhlmann et al. 1999, Burks and Lodge 2002, respectively).

The need to distinguish the effect of the threat of predation from that of a predator-related food 'treat' seems to be of high importance in order to appreciate the adaptive significance of the ability of the prey to benefit from predator-related food. Many small-bodied zooplankton species co-exist successfully with planktivorous fish due to the relatively minor impact of this predator on their community structure and population density (Vanni 1987). Therefore, it is expected that small-bodied zooplankton species may invest less energy in predator avoidance or resistance strategies, either by (1) exhibiting a weaker reaction to the presence of kairomones (Dodson 1988), or (2) choosing less costly defense strategies (e.g., life history adaptations rather than depth selection adjustments, Leibold and Tessier 1991). Since smaller-bodied species (or clones) would more commonly coexist with planktivorous fish and have greater food requirements (Gliwicz 1990), they are possibly better adapted to exploit and benefit from the presence of fish-related bacterial food. Until recently, these bacteria have been associated only with the production (Ringelberg and Van Gool 1998, Beklioglu et al. 2006a) or decomposition of kairomones (Loose et al. 1993, Beklioglu et al. 2006b, Akkas et al. 2010), and have not generally

been considered as an additional food source for planktonic animals. To our knowledge, only one study (Vijverberg and Vos 2006) has demonstrated that the presence of fish can affect the feeding conditions of planktonic animals. However, this was interpreted as a result of an improvement in food quality rather than its higher quantity.

The aim of this study was to try and disentangle the signaling effect of fish kairomones from the nutritional effect of fish-related supplementary bacterial food (at low and high algal food concentration) on the growth rate and plasticity of the life history traits of two *Daphnia* species (*D. cucullata* and *D. hyalina*) common in European lakes. Such an experimental approach allowed us to test (1) whether fish exudates and feces can affect the growth, reproduction and survival of zooplankton, not exclusively due to the presence of kairomones, but also due to the input of fish-related bacteria, (2) if the effect of surplus microbial food related to the presence of fish is greater at low than at high algal food concentration and is more important in the smaller species that is less vulnerable to fish predation, and (3) whether the effect of kairomones alone (solely as information on predation risk) is greater in the larger bodied species, and at high rather than low algal food concentration.

## MATERIAL AND METHODS

### The approach

Each of the three experiments was performed using two *Daphnia* species and a  $2 \times 2$  factorial design including fish-conditioned and non-conditioned (control) water medium, at high and low algal food level (*Scenedesmus obliquus* at initial concentrations of 1.0 and 0.1 mg C/L, respectively, with food concentrations ranging from 96 to 78% of the starting values at the time of media replacement). According to preliminary experiments, it was assumed that the concentration of fish kairomones in fish treatments was the same in each experiment (the effect of kairomone degradation by bacteria was negligible). To test the effect of additional bacterial food on the growth rate and life histories of *Daphnia*, the abundance of bacteria in each experiment (high, medium and low;  $E_{high}$ ,  $E_m$  and  $E_{low}$  respectively) was modified by employing different filtration protocols.

From the start of each experiment, animals were individually cultured in 100 ml beakers (containing 90 ml of medium) from the early neonate stage (0–6 h after birth) until the second adult instar. The culture beakers were placed in a water bath to ensure a constant temperature of  $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$  and illuminated with a summer photoperiod (16 h light:8 h dark). The lake water (eutrophic Lake Gora, Warsaw, Poland) used in all experiments was aged (>14 days), filtered (2.0  $\mu\text{m}$ , Sartorius) and aerated to remove possible traces of information on conspecifics or predators (kairomones, Loose et al. 1993). Experimental media were prepared and replaced every 16 hours. In this study, a filtration protocol instead of antibiotic treatment (which has been occasionally recommended, Ringelberg and Van Gool 1998, Beklioglu et al. 2006a) was used to remove bacteria for three reasons. First, we were concerned that a single antibiotic might not remove all bacteria (Ozaktas 2007); second, we were aware of possible side effects of these compounds on the experimental animals that could potentially affect their life history features; and third, we aimed to obtain results comparable with those of earlier kairomone studies and therefore we employed a standard filtration method (Macháček 1991, Stibor 1992, Doksaeter and Vijverberg 2001).

Prior to filtration, half of the lake water (25L) was conditioned by adding five small planktivorous fish ( $10 \pm 1$  cm, roach [*Rutilus rutilus*]), and holding the water at a constant temperature of  $20 \pm 0.1^\circ\text{C}$  for 16 h. The roach were transferred from a separate tank where they had been fed once a day with a standard amount ( $\sim 20$  ind. per fish) of frozen *Chironomidae* larvae. The other half of the lake water was held at the same temperature in the same type of 30 L aquarium without fish (control).

#### Experimental animals

*Daphnia hyalina* (clone HG011, Lake Swiecajty, Poland) and *D. cucullata* (clone C006, Lake Tjeukemeer, Netherlands) used in the experiments are known to exhibit strong phenotypic responses to the presence of fish medium (Gliwicz et al. 2012). To minimize possible maternal effects (Lynch and Ennis 1983), all animals came from the second clutch of fourth-brood females from long established synchro-

nized laboratory cultures that had been maintained in 4 L jars with aged (>14 days), aerated and 2.0- $\mu\text{m}$ -filtered lake water, and fed daily with *Scenedesmus* at a concentration above the incipient food level (1.0 mg C/L).

#### Experimental design

At the beginning of each experiment, 320 synchronized neonates (160 per species) were randomly distributed between four treatments (80 individuals per treatment): fish-conditioned or control water medium, at low or high algal food level.

Depending on the experiment, both the control and kairomone media were filtered through 2.0, 0.45 or 0.20- $\mu\text{m}$  Sartorius membrane filters (in  $E_{\text{high}}$ ,  $E_{\text{m}}$  and  $E_{\text{low}}$  respectively). The filtration procedure used in  $E_{\text{high}}$  (2.0  $\mu\text{m}$ ) allowed the greatest number and biomass of bacteria to remain, but removed all suspended particles, while the procedures used in  $E_{\text{m}}$  (standard in kairomone studies) and  $E_{\text{low}}$  resulted in a step-wise decrease in the biomass of available bacterial food and minimized the difference in bacterial levels between the fish and control media. Filtered fish-conditioned and control water was then mixed with different volumes of algal suspension (initial concentrations) in which the organic carbon content had been calculated from a calibration curve relating organic carbon to absorbance at 800 nm.

To determine the initial size and the level of ovary lipid droplets in the *Daphnia*, 20 randomly chosen neonates from each species were photographed under a dissecting microscope. They were then preserved in formalin (25%), rinsed, dried (12 h at  $60^\circ\text{C}$ ) and weighed on a microbalance scale (Orion-Cahn C-35). By examination of the photographs using MultiScan image analysis software (Computer Scanning Systems) each individual was measured from the top of the eye to the base of the tail spine and the amount of body lipid reserves was calculated as the cumulative volume of ellipsoidal droplets (droplet volume was calculated from the shortest and the longest diameters).

In each experiment, all animals were checked for molting and survival every 8 hours during the juvenile stage and the first two adult instars. Each successfully molted individual was photographed and their size and the volume of lipid

reserves were determined as described above. Simultaneously, every 24 hours, two randomly chosen animals from each treatment were taken for body mass estimation. To determine the somatic growth rate, 6 individuals at first reproduction (same physiological stage) from each species in each treatment were dried and weighed. Body growth rate was determined as  $g = (\ln C_t - \ln C_0)/t$ , where  $C$  is the body mass of a newborn neonate ( $C_0$ ) and an adult *Daphnia* after oviposition ( $C_t$ ).

When the first and second clutch of eggs had been deposited into the brood chamber (first and second reproduction) the following life history parameters were recorded for each *Daphnia*: age and size at reproduction, number of eggs per clutch and the volume of each egg (where visible) in the brood cavity (calculated as for lipid droplets). In addition, when the first eggs were laid, lipid droplets in the body were counted and taken to represent reserves remaining after reproduction. Total lipid volume was calculated as the sum of the integrated droplet volumes in eggs, plus the reserves remaining in the body.

#### Nutritional currencies of the bacterial and algal food

*Organically bound phosphorus content.*—The initial values (immediately after filtration) of organically bound phosphorus associated with bacteria ( $P_{orgB}$ ) were determined in triplicate samples (1000 ml) of both the fish and control media taken during the first and the last days of each experiment (each time prior to mixing the media with the algal food).  $P_{orgB}$  was calculated as the difference between total phosphorus (TP) and the cumulative amount of reactive orthophosphates with acid-hydrolysable P. To determine the initial TP content of each sample, half of the volume was ashed at 550°C for 6 hours, suspended in 10 ml distilled water and 2.4 ml of 10 N  $H_2SO_4$ , and digested at 100°C to solubilize reactive orthophosphates. To determine the level of acid-hydrolysable P among the reactive orthophosphates, the other half of the sample volume was autoclaved at 120°C with  $K_2S_2O_8$  for 2 hours to convert acid-hydrolysable P into soluble reactive orthophosphates. Finally, the concentration of soluble reactive orthophosphates in each half of the sample was determined using the standard stannous chloride method

(Murphy and Riley 1962).

The initial content of organically bound P in algae ( $P_{orgSc}$ ), at both *Scenedesmus* concentrations (1.0 and 0.1 mg C/L), was determined in triplicate volumes (1000 ml) of sterilized (boiled) and filtered (through 0.2  $\mu m$ -filter mesh size to remove bacteria) water that had been mixed with algal food suspension during the first and the last days of each experiment. The analytical procedure was the same as that used for  $P_{orgB}$  determination.

*Particulate organic carbon content (POC).*—The particulate organic carbon content of bacteria and algae was calculated separately through enumeration of their cells. This was done on the first and last days of each experiment for triplicate 15-ml samples of each freshly prepared medium and subsequently for samples of each medium 8 and 16 hours after the filtration procedure (each medium was mixed before samples were taken). Each sub-sample of medium was fixed by adding formaldehyde solution (final conc. 2%), and analyzed within 14 days using epifluorescence microscopy.

After standard DAPI staining (Porter and Feig 1980), the bacterial cell number in each sample was counted in 14 random fields of view with a Nikon Eclipse E400 microscope equipped with an epifluorescence device using NIS Elements 2.3 software. The total number of bacteria ( $ml^{-1}$ ), was calculated using the equation  $NB = n \times FV / V_{fv} \times V$ , where  $n$  is the mean number of bacteria in a single field of view,  $FV/V_{fv}$  is the ratio between the total filter area ( $FV = 254,469 \mu m^2$ ) and the cumulative area of 14 analyzed fields of view ( $V_{fv} = 5519 \mu m^2$ ), and  $V$  is the sample volume. The particulate organic carbon content of bacteria ( $POC_{bac}$ ) was calculated using the Psenner equation (Psenner 1993) based on bacterial cell counts.

Algal cells in each sample were subsequently counted in the same 14 fields of view, using red auto-fluorescence for identification. The particulate algal organic carbon in each sample was calculated from a calibration curve, relating the POC of *Scenedesmus* to the number of cells, prepared before the start of the experiments.

#### Efficiency of exploitation of bacterial food

The inter-setular distances in the filtering screen of *Daphnia* in each experiment were



measured by light microscopy ( $\times 1600$  immersion lens) for three randomly chosen individuals from each experimental treatment on the 3rd and 8th–10th day of life, i.e., after the instar with a minimum volume of accumulated lipid reserves and during the second adult instar, respectively. Prior to measurement, the animals were preserved in 4% sugar formaldehyde and the endopodites were dissected from the third pair of thoracic legs of each individual (two endopodites per *Daphnia*) and transferred in a drop of glycerol onto a microscope slide (Bednarska and Dawidowicz 2007). The filter screens were then photographed and inter-setular distances were measured at 10 locations in the middle of the setae using MultiScan image analysis software.

## RESULTS

### Cumulative data from all experiments ( $E_{\text{high}}$ , $E_m$ and $E_{\text{low}}$ )

*Phosphorus content.*—The cumulative data from all experiments revealed that the initial concentrations of organically bound P associated with bacteria ( $_{\text{in}}P_{\text{orgB}}$ ) as well as the percentage of the initial  $P_{\text{orgB}}$  to the initial  $P_{\text{orgB+Sc}}$  were higher in the fish medium than the control, and lower in media filtered through the smaller mesh size filters ( $p < 0.0020$ , ANOVA, Table 1).

*Particulate organic carbon content (POC).*—The initial and the mean (1) particulate organic carbon of bacteria ( $_{\text{in}}\text{POC}_B$  and  $_{\text{mean}}\text{POC}_B$ , respectively), (2) percentages of  $\text{POC}_B$  to total POC of the algae and bacteria ( $_{\text{in}}\text{POC}_B \times _{\text{in}}\text{POC}_{B+\text{Sc}}^{-1}$  and  $_{\text{mean}}\text{POC}_B \times _{\text{mean}}\text{POC}_{B+\text{Sc}}^{-1}$ , respectively), as well as (3) the number of bacteria ( $_{\text{in}}N_B$  and  $_{\text{mean}}N_B$ , respectively) were (1) higher in fish medium than the control ( $p < 0.0001$ , Table 1), (2) lower in media filtered through smaller mesh size filters ( $p < 0.0001$ , Table 1), and (3) not influenced by the algal concentration (three-way ANOVA). The difference between the mean ( $\pm 1$  SD) POC of bacteria in fish medium and the control was highest in  $E_{\text{high}}$  ( $0.26 \pm 0.05$  mg C/L), moderate in  $E_m$  ( $0.09 \pm 0.03$  mg C/L) and lowest in  $E_{\text{low}}$  ( $0.01 \pm 0.00$  mg C/L). The difference in mean POC of bacteria between the control and fish medium was insignificant only in  $E_{\text{low}}$  (two-way ANOVA). POC of algae decreased slightly during the 16 h between filtration procedures (four-way ANOVA,  $p < 0.0411$ ). The C:P ratio

(cumulative data from each treatment in each experiment) was approximately ten times lower for bacteria than for algae ( $9.3 \pm 7.7$  and  $104.1 \pm 13.4$ , respectively).

*The filtering apparatus.*—The mean ( $\pm 1$  SD) inter-setular distances in the filtering screen of juvenile *Daphnia cucullata* (*Dc*) were smaller than those of juvenile *D. hyalina* (*Dh*) ( $0.31 \pm 0.04$  and  $0.41 \pm 0.03$ , respectively,  $p < 0.0001$ , rmANOVA) for each treatment in each experiment ( $n = 360$ , 10 inter-setular distances measured in each of 3 individuals). In adults (after the second adult instar) the difference was smaller ( $0.51 \pm 0.04$  in *Dc*, and  $0.56 \pm 0.05$  in *Dh*,  $p < 0.0001$ , rmANOVA). In both juveniles and adults, elevation of the regression of inter-setular distance versus body length in *Dc* was lower (ANCOVA,  $p < 0.0001$ ), and the slope (ANCOVA,  $p < 0.0012$ ) higher, than in *Dh*.

*The factors and interactions affecting Daphnia growth and life history parameters.*—Bacterial food (B factor, different numbers of bacteria in subsequent experiments resulting from different filtration procedures during media preparation) affected the individual growth rate (GR), age and size at first (AFR and SFR, Table 2) and second reproduction (ASR and SSR,  $p < 0.0005$ , three-way ANOVA) in both *Daphnia* species. However, a higher level of this food reduced the number of pre-adult instars, and increased (1) egg volume, (2) the volume of body lipid reserves during the second instar, and (3) the integrated volume of lipid reserves (in body and eggs) in the first-clutch females, but only in *Dc* (Table 2). Furthermore, only in *Dc*, the decrease in the volume of natal lipid reserves during the first two instars was considerably slower at high ( $E_{\text{high}}$ ) than at low ( $E_{\text{low}}$ ) bacterial food level (comparison of slopes, ANCOVA, Table 3). There was 100% survival of *Dh* to the second reproduction in each experiment, but for *Dc* this occurred only in the experiment with the high bacterial level ( $E_{\text{high}}$ ). During the experiment with the intermediate bacterial level ( $E_m$ ), survival to second reproduction ranged from 85% (in the control at the low algal food concentration) to 97% (in the fish medium at the low algal food concentration), and all mortality occurred between days 2 and 3. The lowest rate of survival to second reproduction occurred at the low bacterial food level ( $E_{\text{low}}$  survival ranged from

Table 1. The initial quality of bacterial food shown as organically bound phosphorus ( $\text{inP}_{\text{org}}$ ) and the percentage of  $\text{inP}_{\text{orgB}}$  to total organically bound phosphorus ( $\text{inP}_{\text{orgB+Sc}}$ ), the initial and mean quantities of bacterial food shown as the particulate organic carbon content ( $\text{inPOC}$  and  $\text{meanPOC}$ , respectively), the percentage of  $\text{POC}_B$  to total POC, and the number of bacteria ( $N_B$ ) in the course of each of the three experiments ( $E_{\text{high}}$  high;  $E_{\text{mv}}$  medium; and  $E_{\text{low}}$  low bacterial food level; indicated in the second row of column headings). Each value is shown for high and low algal (*Scenedesmus obliquus*) food concentrations (indicated in the top row of column headings), in no-fish (control, C) and fish ( $F_m$ ) medium. All POC estimations ( $n = 252$ ), as well as all  $\text{P}_{\text{org}}$  estimations ( $n = 252$ ) are the means for 3 samples ( $n = 3$ ) taken twice during each of the experiments (on the first and the last days,  $n = 6$ ), while bacterial cell numbers were counted in 14 fields of vision ( $n = 14$ ). POC estimations were made for both the initial and the mean value (0 h and 0, 8 and 16 hours after the filtration procedure, respectively).  $\text{P}_{\text{org}}$  estimations were made only for the initial value (0 h after the filtration procedure).

Trait	High		High		High		Low		Low		Low	
	High		Medium		Low		High		Medium		Low	
	C	$F_m$	C	$F_m$	C	$F_m$	C	$F_m$	C	$F_m$	C	$F_m$
$\text{inP}_{\text{orgB}}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	1.4	9.2	0.6	1.1	0.2	0.3	1.4	9.1	0.6	1.0	0.2	0.2
$\text{inP}_{\text{orgB}} \times \text{inP}_{\text{orgB+Sc}}^{-1}$ (%)	14	49	6	11	2	3	57	89	33	48	13	13
$\text{inPOC}_B$ (mg/L)	0.01	0.20	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.21	0.00	0.02	0.00	0.00
$\text{inPOC}_B \times \text{inPOC}_{B+Sc}^{-1}$ (%)	1	18	1	1	1	1	10	68	1	19	2	2
$\text{meanPOC}_B$ (mg/L)	0.08	0.31	0.01	0.11	0.00	0.01	0.05	0.35	0.00	0.08	0.01	0.01
$\text{meanPOC}_B \times \text{meanPOC}_{B+Sc}^{-1}$ (%)	8	24	1	11	1	1	31	76	2	44	10	10
$\text{inN}_B$ (no. cells $\times 10^5$ )	2.6	14.7	0.7	0.8	0.3	0.1	1.7	19.1	0.6	1.7	0.4	0.3
$\text{meanN}_B$ (no. cells $\times 10^5$ )	8.0	29.0	1.0	8.1	0.8	0.9	7.1	30.1	0.9	6.7	1.3	0.8

Table 2. Analysis of data from all experiments ( $E_{\text{high}}$ ,  $E_m$  and  $E_{\text{low}}$ ) by three-way ANOVA ( $F$ ,  $p$  and degrees of freedom) to test the significance of the effect of bacterial food (B), algal food (Sc), fish medium ( $F_m$ ), and interactions between these factors in *D. hyalina* (*Dh*) and *D. cucullata* (*Dc*) on individual growth rate from newborn neonates to ovigerous adults (GR), size at first reproduction (SFR), age at first reproduction (AFR), the number of pre-adult instars (Instars), minimum volume of body lipid reserves (Lipid volume; Juvenile), integrated egg and body volume of lipids in the first-clutch females (Lipid volume; Adult), and egg volume. Statistical significance is accepted at  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.005$  or  $***p < 0.0005$ . NS indicates no significance.

Factor, interaction	GR		SFR		AFR		Instars		Lipid volume				Egg volume	
									Juvenile		Adult			
	$F$	$p$	$F$	$p$	$F$	$p$	$F$	$p$	$F$	$p$	$F$	$p$	$F$	$p$
<i>Dh</i>														
B	45	***	16	***	20	***	0	NS	0	NS	1	NS	2	NS
Sc	161	***	167	***	64	***	0	NS	16	***	61	***	8	**
$F_m$	43	***	118	***	32	***	16	***	0	NS	0	NS	64	***
$B \times Sc$	3	NS	4	*	9	***	0	NS	16	***	2	NS	2	NS
$F_m \times Sc$	23	***	9	**	5	*	0	NS	9	**	1	NS	1	NS
$F_m \times B$	4	*	3	NS	0	NS	0	NS	0	NS	3	NS	1	NS
$F_m \times B \times Sc$	0	NS	4	NS	0	NS	0	NS	0	NS	2	NS	0	NS
<i>Dc</i>														
B	98	***	32	***	221	***	163	***	41	***	110	***	11	***
Sc	149	***	1	NS	46	***	91	***	2	NS	44	***	1	NS
$F_m$	5	*	118	***	79	***	66	***	3	NS	28	***	46	***
$B \times Sc$	1	NS	7	**	39	***	28	***	4	*	43	***	1	NS
$F_m \times Sc$	1	NS	2	NS	52	***	50	***	1	NS	12	**	11	**
$F_m \times B$	11	**	4	*	8	**	5	*	0	NS	6	**	5	**
$F_m \times B \times Sc$	0	NS	6	*	3	NS	3	NS	0	NS	3	NS	1	NS

Notes: Error degrees of freedom for *Dh*: GR, 74; SFR, AFR, instars, 344; lipid volume for juveniles and adults, 304; egg volume, 319. Error degrees of freedom for *Dc*: GR, 72; SFR, AFR, instars, 304; lipid volume for juveniles and adults, 303; egg volume, 305.

Table 3. Results of ANCOVA ( $F$ ,  $p$ ,  $df$ ) for differences in slope and elevation of regressions in the fish medium and the control for *D. hyalina* ( $Dh$ ) and *D. cucullata* ( $Dc$ ) clutch size versus body length at first reproduction (clutch size on body length), and changes in lipid reserves from the instar with the minimum volume of lipids until first reproduction (body lipid reserves on age), at high (1.0 mg C/L) and low (0.1 mg C/L) algal food concentrations (indicated in the top row of column headings) and at different levels of bacteria as an additional food (indicated in the second row of column headings): high ( $E_{high}$  0.07 mg C/L in control and 0.33 mg C/L in fish medium), medium ( $E_m$  0.01 mg C/L in control and 0.10 mg C/L in fish medium), and low ( $E_{low}$  0.01 mg C/L in control and 0.01 mg C/L in fish medium). Statistical significance is accepted after Bonferroni's adjustment for 12 comparisons at  $*p < 0.00427$ ,  $**p < 0.00043$  or  $***p < 0.00004$ . NS indicates no significance.

Characteristic	High			High			High			Low			Low			Low		
	High			Medium			Low			High			Medium			Low		
	$F$	$p$	$df$	$F$	$p$	$df$	$F$	$p$	$df$	$F$	$p$	$df$	$F$	$p$	$df$	$F$	$p$	$df$
Clutch size on body length																		
<i>Dh</i>																		
Slope	0.5	NS	1.61	0.1	NS	1.61	0.1	NS	1.54	0.4	NS	1.44	0.8	NS	1.41	1.8	NS	1.50
Elevation	9.1	*	1.62	9.0	*	1.62	8.4	*	1.55	17.1	**	1.45	8.0	*	1.41	6.8	*	1.51
<i>Dc</i>																		
Slope	3.8	NS	1.60	0.5	NS	1.49	0.1	NS	1.36	11.9	*	1.30	8.8	*	1.45	0.1	NS	1.60
Elevation	18.7	**	1.60	26.3	**	1.50	20.9	**	1.37	26.2	***	1.31	19.2	**	1.46	16.4	**	1.61
Body lipid reserves on age																		
<i>Dh</i>																		
Slope	2.7	NS	1.10	0.3	NS	1.10	0.1	NS	1.93	5.3	NS	1.98	1.6	NS	1.97	6.1	NS	1.10
Elevation	5.7	NS	1.11	6.3	NS	1.11	0.1	NS	1.94	6.2	NS	1.99	5.0	NS	1.98	9.1	*	1.10
<i>Dc</i>																		
Slope	8.1	*	1.11	0.7	NS	1.74	0.5	NS	1.96	18.8	**	1.12	16.6	**	1.14	8.5	*	1.12
Elevation	16.7	**	1.11	2.5	NS	1.75	1.0	NS	1.97	84.2	***	1.12	8.1	*	1.14	6.7	NS	1.12

50% in the control to 69% in the fish medium, at both algal food concentrations). Notably, between 74-100% of individuals died between the 2nd and 4th days of life.

In contrast to the effect of bacterial food, algal food (Sc factor, low or high concentration of algae) improved feeding conditions for *Dh* to a greater extent than for *Dc* (Table 2). Only in the case of the number of pre-adult instars was the influence of this effect reversed.

The presence of fish medium ( $F_m$  factor, kairomones and fish-related bacteria) generally reduced GR (Fig. 1), as well as body size in subsequent instars (Fig. 2), egg volume, SFR (Table 2), and SSR ( $p < 0.0001$ , three-way ANOVA) in both species. The exception was GR at the high bacterial food level ( $E_{high}$ ) and body size (SFR, SSR) at high and medium bacterial food level ( $E_{high}$  and  $E_m$ ). The effect of the  $F_m$  factor was evident in the acceleration of AFR (Fig. 3) and ASR in both species (Table 2). In *Dh*, first reproduction was observed mostly in the 5th instar (100% of animals in the control and 90–97% in the fish medium), while in *Dc* it occurred between the 4th and 8th instars (Fig. 3). Although some *Dh* individuals reached maturity earlier in

the fish medium than in the control (4th instar; Fig. 3A and 3B), the variance of AFR was greater in the fish treatment, but only at the low algal food concentration (Fisher's  $F$  Distribution, Table 4). Both *Daphnia* species had a greater clutch size vs. body length in fish medium compared with the control (Table 3, ANCOVA). In *Dc*, fish medium (1) increased the integrated egg and body volume of lipid reserves in the first-clutch females (Table 2), (2) increased the level of lipid reserves (comparison of elevations) and (3) enhanced the rate of increase in lipid reserves from the instar with the minimum volume of such reserves until first reproduction (comparison of slopes, Table 3). In *Dh*, it lowered the level of lipid reserves, but only at high bacterial and low algal food concentrations ( $E_{low}B$ , Table 3, comparison of elevations).

The effect of bacterial food was generally more apparent at low than at high algal food concentration (Table 2,  $B \times Sc$  interaction), and seemingly more evident in *Dc* (Figs. 2, 3 and 4). When the effect of kairomones prevailed over the effect of fish-related bacterial food, the cumulative effect of fish medium was more apparent at high than at low algal concentration (e.g., Fig. 1

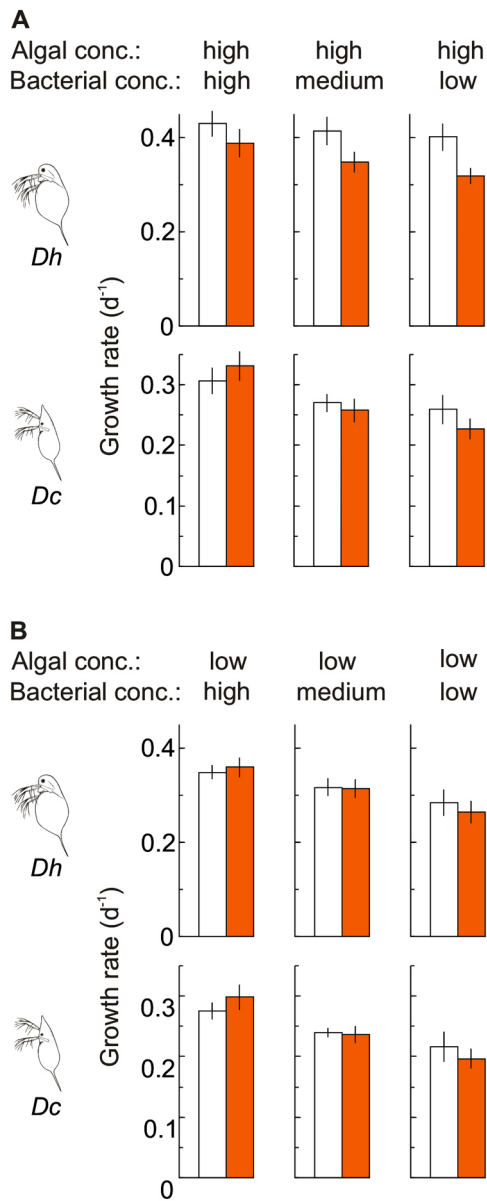


Fig. 1. Mean ( $\pm 1$  SD) somatic growth rate of individually cultured *D. hyalina* (*Dh*, upper panel) and *D. cucullata* (*Dc*, lower panel), from a neonate (0.00–0.25 d) until first reproduction, in fish medium (red bars) and the control (empty bars), at high (1.0 mg C/L, panel A) and low (0.1 mg C/L, panel B) algal food concentration and at different levels of bacteria as an additional food: high ( $E_{high}$ , 0.07 mg C/L in control and 0.33 mg C/L in fish medium), medium ( $E_m$ , 0.01 mg C/L in control and 0.10 mg C/L in fish medium), and low ( $E_{low}$ , 0.01 mg C/L in control and 0.01 mg C/L in fish medium).

in *Dh*). Otherwise, the effect of kairomones was more apparent at the low algal food level (Table 2, Figs. 3 and 4 for *Dc*).

The effect of fish-related bacterial food ( $F_m \times B$  interaction) was generally greater under low algal food conditions and more apparent in *Dc*. Such an effect may consist of either an increase or a decrease in the difference between fish medium and the control at the different bacterial concentrations. In both *Daphnia* species, fish-related bacterial food influenced GR (Table 2), the clutch size versus body length at first reproduction (Table 3), and the accumulation of lipid reserves from the minimum level until first reproduction (Table 3). The difference in GR between control and fish medium was negligible in *Dh* and negative in *Dc* at high bacterial abundance ( $E_{high}$ ), but this changed to positive values under intermediate ( $E_m$ ) and low ( $E_{low}$ ) bacterial food conditions (Fig. 1). In both species, the difference in clutch size on body length was greatest at high ( $E_{high}$ ), lower at intermediate ( $E_m$ ) and lowest at the low ( $E_{low}$ ) bacterial food level, but only at the low algal food concentration (Table 3).

In *Dh*, the difference in the accumulation of lipids from the minimum level until first reproduction was highest at the low bacterial food level (Table 3, comparison of elevations in  $E_{low}$  at low algal food concentration). The direction of this difference was reversed in *Dc* (Table 3, Fig. 4). Moreover, only in *Dc* did the effect of fish-related bacterial food influence (1) SFR, (2) AFR, (3) variance in AFR, (4) the number of pre-adult instars, (5) egg volume in the first-clutch females, and (6) the integrated egg-body volume of lipids. In SFR, with reducing bacterial food concentration (from  $E_{high}$ ,  $E_m$  to  $E_{low}$ ), the difference increased at high (diff.  $-0.01$ ,  $0.02$ ,  $0.04$  mm, Fig. 2A) and decreased at low (diff.  $-0.03$ ,  $0.02$  and  $0.01$  mm, Fig. 2B) algal food concentration (significant  $F_m \times B \times S_c$  interaction). The difference in AFR (Fig. 2), the number of pre-adult instars (Figs. 2 and 3), and the integrated egg-body volume of lipids (Fig. 4) was large at high ( $E_{high}$ ) and decreased at the intermediate ( $E_m$ ) to low ( $E_{low}$ ) bacterial food level. The difference in egg volume was relatively low at high ( $E_{high}$ ), slightly higher at intermediate ( $E_m$ ), and much higher at the low ( $E_{low}$ ) bacterial food level. Fish-related bacteria lowered the variance in AFR (Fig. 3) and that of the second reproduc-

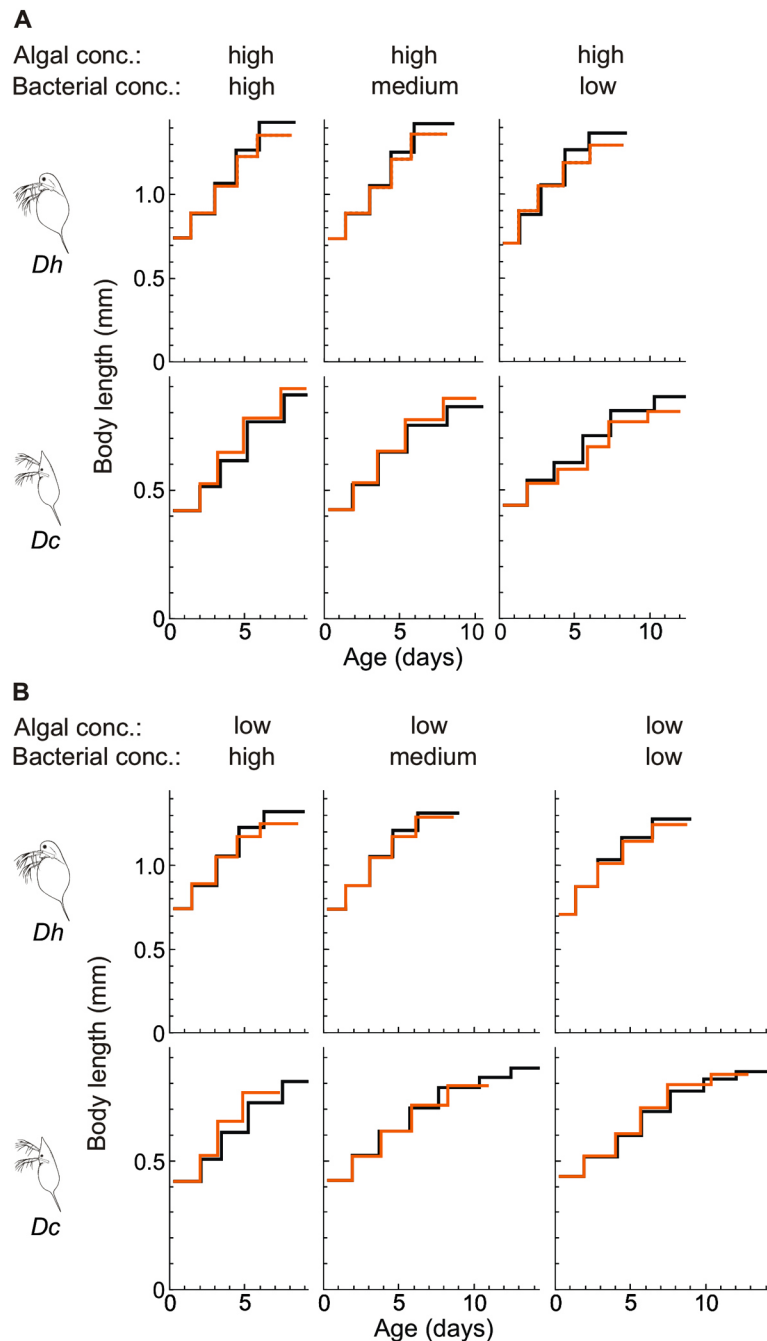


Fig. 2. Instar-to-instar mean ( $\pm 1$  SD) body length increase in *D. hyalina* (Dh, upper panel) and *D. cucullata* (Dc, lower panel), from a neonate (0.00–0.25 d) until release of the first neonates (females with the second clutch of eggs), in fish medium (red line) and the control (black line), at high (1.0 mg C/L, panel A) and low (0.1 mg C/L, panel B) algal food concentrations and at different levels of bacteria as an additional food: high ( $E_{\text{high}}$ ), medium ( $E_{\text{m}}$ ) and low ( $E_{\text{low}}$ ). It was assumed that the body length of a freshly molted *Daphnia* would not change until the next molt (body length of each animal was checked again at that time).



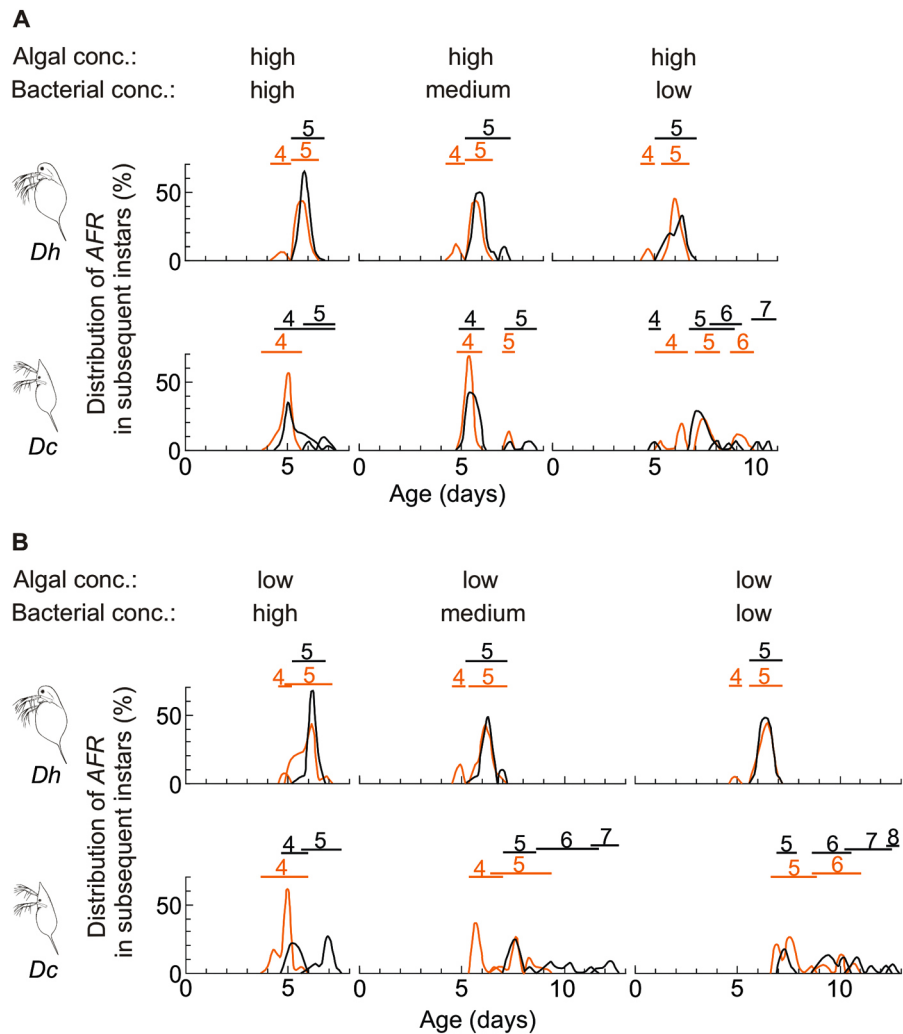


Fig. 3. Distribution (%) of the age at first reproduction (+4 h after eggs were laid in the brood chamber) in *D. hyalina* (*Dh*, upper panel) and *D. cucullata* (*Dc*, lower panel) in the fish medium (red line) and the control (black line), at high (1.0 mg C/L, panel A) and low (0.1 mg C/L, panel B) algal food concentrations and at different levels of bacteria as an additional food: high ( $E_{\text{high}}$ ), medium ( $E_{\text{m}}$ ) and low ( $E_{\text{low}}$ ). Horizontal bars show the duration of each adult instar (from the 4th to the 5th, 6th, 7th or 8th) in the presence (red) and absence (black) of kairomones.

tion, thus increasing the difference in variance between fish medium and the control (Fisher's  $F$  Distribution, Table 4,  $E_{\text{low}}$ ).

#### Experiment with kairomones alone (negligible effect of bacteria, $E_{\text{low}}$ )

Analysis of the data from  $E_{\text{low}}$  alone showed that both GR and SFR (Figs. 1 and 2) were (1) lower in the presence of kairomones ( $F_{\text{k}}$  factor) than the control, (2) higher at high, than at low

algal food concentration, and (3) higher in *Dh* than *Dc* (Table 5). Although the stronger effect of kairomones at the high algal food concentration ( $F_{\text{k}} \times S_{\text{c}}$  interaction) was not related to the *Daphnia* species (non-significant interaction  $F_{\text{k}} \times S_{\text{p}}$ ), the effect of algae was stronger in *Dh* than in *Dc* (Table 5,  $S_{\text{c}} \times S_{\text{p}}$ ). The AFR and the number of pre-adult instars were affected by each of the three factors, but neither the  $F_{\text{k}} \times S_{\text{c}}$  nor the  $F_{\text{k}} \times S_{\text{p}}$  interactions (Fig. 3, Table 5). The effect of algal

Table 4. Fisher's  $F$  distribution ( $F$ ,  $p$ ,  $df$ ) for differences in the variance of age at first reproduction (Fig. 2) for *D. hyalina* ( $Dh$ ) and *D. cucullata* ( $Dc$ ) in fish medium and the control, at high (1.0 mg C/L) and low (0.1 mg C/L) algal food concentrations (indicated in the top row of column headings) and at different levels of bacteria as an additional food (indicated in the second row of column headings): high ( $E_{high}$  0.07 mg C/L in control and 0.33 mg C/L in fish medium), medium ( $E_{mv}$  0.01 mg C/L in control and 0.10 mg C/L in fish medium), and low ( $E_{low}$  0.01 mg C/L in control and 0.01 mg C/L in fish medium). Statistical significance is accepted after Bonferroni's adjustment for 12 comparisons at  $*p < 0.00427$ ,  $**p < 0.00043$  or  $***p < 0.00004$ . NS indicates no significance. In each comparison,  $df$  is shown for the control (C) and fish (F<sub>m</sub>) treatment.

Species	High			High			High			Low			Low			Low		
	High			Medium			Low			High			Medium			Low		
	$F$	$p$	$df_{C:Fm}$	$F$	$p$	$df_{C:Fm}$	$F$	$p$	$df_{C:Fm}$	$F$	$p$	$df_{C:Fm}$	$F$	$p$	$df_{C:Fm}$	$F$	$p$	$df_{C:Fm}$
<i>Dh</i>	2.29	NS	30:33	2.26	NS	32:37	1.87	NS	26:30	3.76	*	26:32	3.65	*	27:25	3.28	*	23:23
<i>Dc</i>	5.54	***	31:31	2.22	NS	25:26	0.99	NS	21:22	5.91	***	30:32	3.15	*	25:28	2.28	NS	21:22

food on the number of pre-adult instars was stronger in *Dh* than *Dc* (Fig. 3, Table 5,  $Sc \times Sp$ ). The minimum volume of body lipid reserves (in the 2nd–3rd instar) was (1) higher at high than at low algal food concentration, (2) higher in *Dh* than in *Dc*, and (3) not affected by fish kairomones (Table 5). The integrated volume of lipid reserves in eggs and the body in the first-clutch females was lower in the presence of fish kairomones than the control, and greater in *Dh* than in *Dc*. The response induced by kairomones was stronger at high than at low algal food concentration. The egg volume of first-clutch females was lower in the presence of kairomones and greater at high than at low algal food concentration in both *Daphnia* species, but was not affected by any interaction between these factors.

## DISCUSSION

The results of this study indicate that compounds released by planktivorous fish have a dual effect on *Daphnia*. First, through chemical information on predation risk they trigger a phenotypic response to that risk. Second, through the provision of additional high-quality food they stimulate growth and fecundity, and assure higher survival when food is limiting. Our experiments also show that the smaller *Daphnia cucullata* (*Dc*) has a greater ability to retain fish-related bacterial food than *D. hyalina* (*Dh*), due to the smaller filtering mesh size of its juvenile stages. At first glance, such an ability could easily be regarded as a consequence of being smaller.

However, it is equally possible that it stems from the need to avoid resource competition with larger-bodied *Daphnia* by broadening their feeding niche through the inclusion of small particles of high-quality food into their diet, i.e., particles that are not retained by coarser filters. Our results also suggest that the real effect of fish kairomones can only be determined when the effects of fish-related bacteria (degradation of kairomones and obscuring their effects) have been excluded.

The abundance of bacteria in both the fish medium and the control was assumed to be dependent on the mesh size of filters used in preparation of these media which altered the amount of this additional food and its impact on *Daphnia* growth rate and life history parameters. Our findings demonstrate that fish-related bacterial food enhance *Daphnia* growth and reproduction. This was more apparent in the smaller than the larger-bodied *Daphnia* species especially under low algal food conditions. There are two likely reasons why smaller *Dc* may use a 'bacterial treat related to fish' more efficiently. First, this may result from greater efficiency in retaining bacterial food by the finer mesh of its filters, especially in juveniles (see Geller and Müller 1981 and *The filtering apparatus* in the *Results*). This explanation is supported by the higher biomass of bacterial food found in the fish medium than the control. Second, this may be the result of the greater phosphorus demand observed in smaller zooplankton species (Elser et al. 2000, DeMott and Pape 2005), that should fare better when resources are P-enriched (Sterner

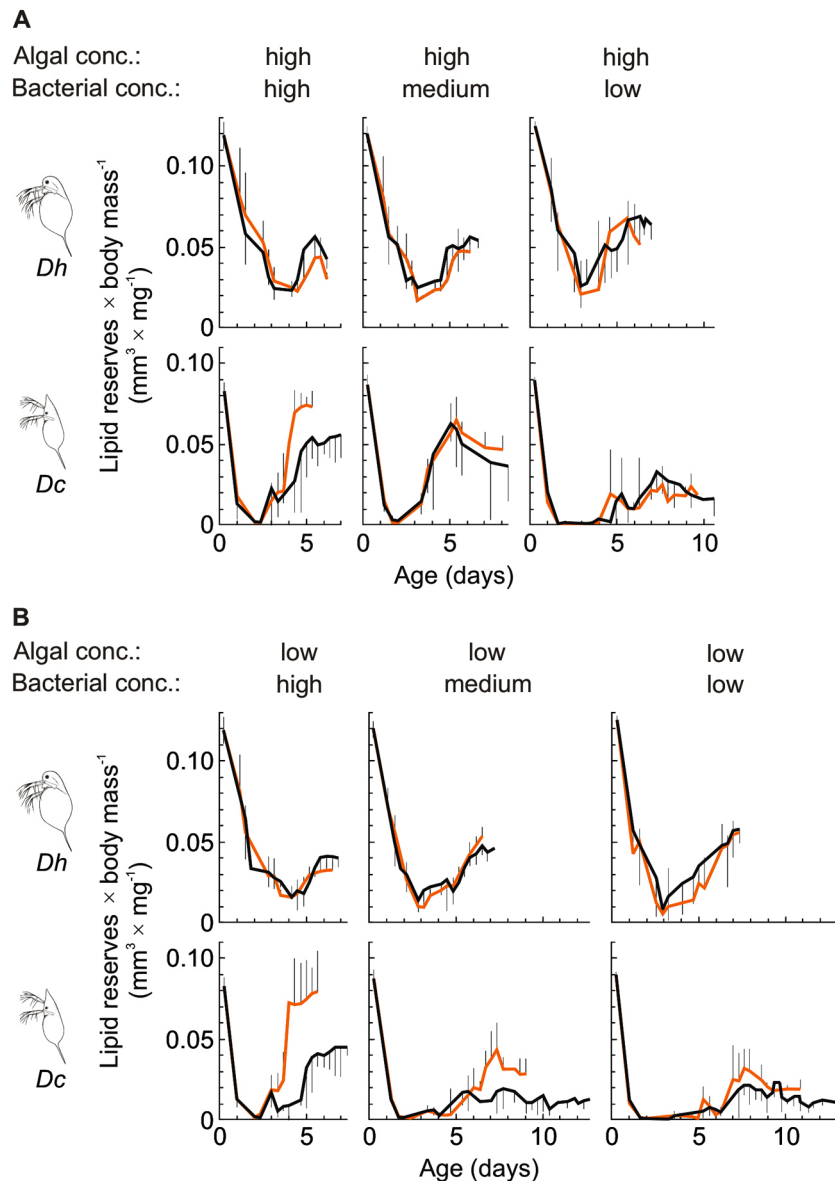


Fig. 4. The evolution of lipid reserves from the initial use of natal reserves, through the accumulation of stored lipids before first reproduction (when the first eggs appear in the brood chamber), in *D. hyalina* (*Dh*, upper panel) and *D. cucullata* (*Dc*, lower panel) in the fish medium (red line) and the control (black line), at high (1.0 mg C/L, panel A) and low (0.1 mg C/L, panel B) algal food concentrations and at different levels of bacteria as an additional food: high ( $E_{\text{high}}$ ), medium ( $E_{\text{m}}$ ) and low ( $E_{\text{low}}$ ). Individual lipid reserves are shown as the ratio (mean  $\pm 1$  SD) of the integrated volume of lipid droplets (mm<sup>3</sup>) to body mass (mg body carbon). Estimates were made every 8 hours for each freshly molted individual.

and Hessen 1994). This explanation is supported by the results of earlier studies (Hessen and Andersen 1990, Sterner and Elser 2002) and by this study that mass- or carbon-specific P content (C:P ratio) was 10-fold lower in bacteria than in

algae.

The greater ability of *Dc* to benefit from fish-related bacterial food can be regarded as a result of its temporal and spatial adaptation to coexist with planktivorous fish. A possible temporal



Table 5. Three-way ANOVA ( $F$ ,  $p$  and  $df$ ) to test the significance of the effect of fish kairomones ( $F_k$ ), algal food ( $Sc$ ), *Daphnia* species ( $Sp$ , *D. hyalina* and *D. cucullata*), and interactions between these factors in experiment at low bacterial levels ( $E_{low}$ ), on individual growth rate from newborn neonates to the ovigerous adults (GR), size at first reproduction (SFR), age at first reproduction (AFR), the number of pre-adult instars (Instars), minimum volume of body lipid reserves (Juvenile), integrated egg and body volume of lipid reserves in the first-clutch females (Adult), and egg volume. Statistical significance is accepted at  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.005$  or  $***p < 0.0005$ . NS indicates no significance.

Factor; interaction	Lipid volume													
	GR		SFR		AFR		Instars		Juvenile		Adult		Egg volume	
	$F$	$p$	$F$	$p$	$F$	$p$	$F$	$p$	$F$	$p$	$F$	$p$	$F$	$p$
$F_k$	32	***	33	***	18	***	17	***	1	NS	7	**	50	***
$Sc$	19	***	10	**	45	***	13	***	88	***	1	NS	10	**
$Sp$	44	***	5931	***	273	***	62	***	641	***	125	***	195	***
$F_k \times Sc$	16	***	10	***	4	NS	3	NS	1	NS	12	**	1	NS
$F_k \times Sp$	6	NS	2	NS	4	NS	5	NS	1	NS	3	NS	2	NS
$Sc \times Sp$	11	**	32	***	4	NS	10	**	87	***	1	NS	4	NS
$F_k \times Sc \times Sp$	4	NS	1	NS	2	NS	0	NS	1	NS	3	NS	2	NS

Notes: Error degrees of freedom: GR, 44; SFR, AFR, instars, 182; juvenile lipid volume, 220; adult lipid volume and egg volume, 192.

adaptation is increased efficiency in utilizing nanoplanktonic food when fish are abundant. Such an adaptation could give smaller *Daphnia* a competitive advantage, and (together with their lower vulnerability to visually hunting predators, Gliwicz 1969) can lead to their dominance over large-bodied species. This is consistent with the results of Iwabuchi and Urabe (2010), who demonstrated that small cladocerans such as *Ceriodaphnia quadrangula* can outcompete larger *Daphnia pulex* even in the absence of size-selective predation due to their greater ability to benefit from P-rich bacterial food. This is also consistent with the more recent finding by Iwabuchi and Urabe (2012) that the quality of food influences the competitive superiority of a herbivore zooplankton species in terms of threshold food levels. A possible spatial adaptation of *Dc* is its increased efficiency in retaining the smallest food particles on fine mesh size filters in warm, and hence less viscous (Abrusan 2004) subsurface water layers during the summer stratification.

The negligible effect of a 'bacterial treat' when it co-occurs with a strong response to the fish medium in *Dh*, confirms the validity of our assumption that the effect of the fish threat was equally strong in each experiment despite the different biomass of bacteria present. Therefore, it may be speculated that the effect of fish-related bacteria on *Dc* (increased or decreased difference between the fish medium and control) was due to

obscuring the effect of kairomones rather than their degradation.

When the two effects, i.e., that of fish kairomones and that of fish-related bacteria, work in the same direction to cause a change in life history parameters, even a slightly higher density of additional bacterial food related to fish should increase the significance of the difference between the fish and control media. In our study, this was the case when each of the two effects (1) accelerated maturity, (2) increased variability in the age at first reproduction, (3) caused a decline in the number of pre-adult instars, and (4) resulted in increased clutch size vs. body length regressions. This suggests that fish-related bacterial food may have caused an overestimation of the real effect of kairomones on these parameters in some previous studies (e.g., Weider and Pijanowska 1993, Reede and Ringelberg 1998).

Conversely, if the two effects work in the opposite direction, the outcome produced by a higher density of fish-related bacterial food seems to be more complex as it may lead to either a decrease or an inversion of the differences between the fish medium and the control. When the kairomone effect prevailed over that of the bacterial food in each of the three bacterial food levels employed, the inter-treatment difference (between the fish medium and the control) in life history parameters was reduced. This was the case when kairomones caused a decline and

bacterial food caused an increase in (1) growth rate in *Dh*, (2) egg volume in *Dc*, and (3) rate of lipid accumulation in the course of the ontogenetic change from the instar at a minimum lipid volume to the instar at 1st reproduction at the low algal food level in *Dh*. However, when the effect of fish-related bacterial food prevailed over the kairomone effect at the highest bacterial level, the higher density of fish-related bacterial food caused an inversion of the difference between fish medium and the control. This was the case when kairomones caused a decline and fish-related bacterial food caused an increase in growth rate and size at first reproduction in *Dc*. The decrease or inversion of the differences demonstrate that additional bacterial food related to fish could have caused under- rather than over-estimation of the real effect of kairomones on these parameters in some previous studies.

We suggest that the mis- (either over- or under-) estimation of the real effect of kairomones might have been an issue in some earlier kairomone studies performed with fish media and media containing chemical cues from invertebrate predators (e.g., *Chaoborus*, *Notonecta* and *Triops*). In particular, this may be the case in the studies where (1) media were prepared with lake water that had been filtered through filters with mesh sizes coarser than 0.2  $\mu\text{m}$ , (2) bacterial abundance was not rigorously controlled with antibiotics, (3) treatments were made with algal concentrations well below the incipient limiting level, and (4) cladoceran species such as *D. cucullata* and *D. magna*, which are able to benefit from bacterial food, were used (Geller and Müller 1981, and Gophen and Geller 1984). A misestimation of the real effect of kairomones might also have occurred in studies comparing the response of *Daphnia* to the fish medium from lakes with and without planktivorous fish, which showed a smaller effect in species from the former (Macháček 1993, Boersma et al. 1998, Gliwicz and Maszczyk 2007). Our findings suggest that the observed differences may not only be due to a weaker response to predation, but could also result from a greater ability to retain the smallest food particles (Koza and Kořínek 1985, Lampert 1994, Lampert and Brendelberger 1996). Furthermore, a similar misestimation could possibly have occurred in studies comparing the reaction to fish medium of clones from different habitats, like that of Boersma

et al. (1998), who showed that clones of *D. magna* differ widely in their response to fish medium. Our results show that such variation could stem not only from differences in their sensitivity to kairomones, but also from their different abilities to benefit from fish-related bacterial food. Finally, such misestimation could also have occurred when response of *Daphnia* to negative size-selective predation (e.g., invertebrate predation) was tested (Spitze 1991, Jeyasingh and Weider 2005). In those cases selective pressure was found to favor more rapid attainment of a safe body size, thus promoting efficient exploitation of P-rich food (e.g., predator-related bacteria).

The need to separate the effect of chemical information from the effect of food level may be crucial not only in the case of predator-released compounds. It is also important in the case of substances related to the prey. They not only carry information on prey location (foraging kairomones), but may also be used as a source of food. Recently, Weinhold and Baldwin (2011) revealed that a ground-hunting predator, the omnivorous ant (*Pogonomyrmex rugosus*), uses volatile branched-chain aliphatic acids to locate their prey (caterpillars), whereas an obligatory predator of the same prey, the big-eyed bug (*Geocoris* spp.), does not. In this case, infochemicals could themselves be a source of important nutrition or they may be associated with exudates and feces that improve nutritional conditions for the omnivorous predator.

In our study, the treatment where bacterial abundance in the media was reduced by the utilization of the finest (0.2  $\mu\text{m}$ ) filter ( $E_{\text{low}}$ ) revealed the effect of kairomones alone. Such an approach allowed us to attain a similar (difference < 4%) and reasonably low (<10% of total POC bound up in algae and bacteria) biomass of bacteria in both the fish medium and the control (Table 1). The effect of kairomones was similar to that recorded in the majority of previous studies examining the influence of fish medium on the growth rate and life history of *Daphnia* (Riessen 1999, Lass and Spaak 2003). The presence of kairomones resulted in reductions in growth rate, size at first and second reproduction, egg volume (Macháček 1991, Stibor 1992, Weider and Pijanowska 1993), and caused a decline in the egg and body integrated lipid volumes in first-clutch females. Furthermore, kairomones produced (1)

accelerated maturation, (2) an increased number of eggs per clutch vs. body length (e.g., Machacek 1991, Stibor 1992), and (3) a reduced number of pre-adult instars (Sakwinska 2002). Although the results we have obtained are in accordance with those of the previous studies indicated above, the strength of the significance between different algal food conditions, species, and within parameters is more realistic because of the semi-controlled abundance of fish-related bacterial food.

The separation of the effect of kairomones from the effect of fish-related bacterial food could also provide an explanation for some of the inconsistencies found in reports on the effects of predator cues at different concentrations of algal food. While the majority of investigations on the morphological (Wiackowski and Szkarlat 1996), life history (Walls et al. 1991), growth rate (Weetman and Atkinson 2002) and behavioral adjustments (Hays et al. 2001) of *Daphnia* show weaker reactions to kairomones at low food levels, some have not confirmed a synergistic effect (Doksaeter and Vijverberg 2001), and a few observed enhanced anti-predator defenses (Reede and Ringelberg 1995, Weber 2001, Pauwels et al. 2010). In our study, the effect of kairomones alone appeared to be weaker at low than at high algal food concentration. This indicates that the effect of fish-related bacterial food may lead to more significant misestimation of the exclusive effect of kairomones when other food is limited.

When the effect of additional bacterial food was excluded, the effect of kairomones appeared to be equally strong for both *Daphnia* species. Thus, our results do not support two important claims made previously in literature. First, the effect of fish kairomones was not stronger in larger zooplankton species known for their greater susceptibility to size-selective visual predation (Boersma et al. 1996, Spaak et al. 2000). Second, it was not weaker due to the insufficient reduction of the risk of predation by life history adjustments (Sakwinska and Dawidowicz 2005). Removing the effect of fish-related bacteria allowed us to detect the costs of inducible defenses represented by the lower rate of lipid accumulation until the time of first reproduction. Such a reduction was apparent only in *Dh* at the low algal concentration (Fig. 4B) when gains

from the exploitation of fish-related food appear to be lower than the costs of the induced defenses. In some previous kairomone studies, predator-related food may have hidden the real costs of antipredation defenses such as those arising from diel vertical migrations of *Daphnia* exposed to fish (Dawidowicz and Loose 1992), neck teeth formation in *Daphnia* exposed to *Chaoborus* (Spitze 1992, Tollrian 1995), or posterolateral spine formation in *Brachionus calyciflorus* in response to *Asplanchna* (Gilbert 1980).

Although we could exclude the effects of fish-related bacterial food to successfully investigate the effect of kairomones alone on *Daphnia* growth rate and life history, we were unable to examine the effect of a fish-related bacterial 'treat' while excluding the effect of kairomones. This might be more easily achieved when the true nature of kairomones has been determined. Once their chemical identity is known, the quantitative (and qualitative) effects of kairomones may be more readily accounted for. Therefore, elucidation of the true nature of kairomones through detailed and sophisticated studies employing advanced analytical techniques remains an important goal for ecological studies (Pohnert et al. 2007, Akkas et al. 2010).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank W. R. DeMott, Z. M. Gliwicz, E. Głodkowska-Mrówka, J. Levy, M. Slusarczyk, W. F. Vincent, J. Benstead and two anonymous reviewers, for making insightful comments that improved the manuscript, P. Koperski for statistical support, A. Guspier for the enumeration of bacterial and algal cells, A. Hankiewicz for the phosphorus content analysis, as well as J. Malkowski for the measurement of filtering screen parameters in *Daphnia*. This research was supported by grants from the SCSR, Poland, (N N304 067336) to P. Maszczyk and (2P04G01430) to Z. M. Gliwicz, and NCN grant (2011/03/B/NZ8/02093) to Z. M. Gliwicz.

## LITERATURE CITED

- Abrusan, N. G. 2004. Filamentous cyanobacteria, temperature and *Daphnia* growth: The role of fluid mechanics. *Oecologia* 141:395–401.
- Akkas, S. B., A. O. Kepenek, M. Beklioglu, and S. Feride. 2010. Molecular approach to a chemical characterization of fish-exuded kairomone: a Fourier transform infrared spectroscopic study. *Aquatic*

- Sciences 72:71–83.
- Bednarska, A., and P. Dawidowicz. 2007. Change in filter-screen morphology and depth selection: Uncoupled responses of *Daphnia* to the presence of filamentous cyanobacteria. *Limnology and Oceanography* 52:2358–2363.
- Beklioglu, M., M. Telli, and A. Gozen. 2006a. Fish and mucus-dwelling bacteria interact to produce a kairomone that induces diel vertical migration in *Daphnia*. *Freshwater Biology* 51:2200–2206.
- Beklioglu, M., A. Cetin, P. Zorlu, and D. Ay-Zog. 2006b. Role of planktonic bacteria in biodegradation of fish-exuded kairomone in laboratory bioassays of diel vertical migration. *Archiv für Hydrobiologie* 165:89–104.
- Blom, J. F., K. Horňák, K. Šimek, and J. Pernthaler. 2010. Aggregate formation in a freshwater bacterial strain induced by growth state and conspecific chemical cues. *Environmental Microbiology* 12:2486–2495.
- Boersma, M., O. F. R. Van Tongeren, and W. M. Mooij. 1996. Seasonal patterns in the mortality of *Daphnia* species in a shallow lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 53:18–28.
- Boersma, M., P. Spaak, and L. De Meester. 1998. Predator-mediated plasticity in morphology, life-history and behaviour of prey species: the uncoupling of responses. *American Naturalist* 152:237–248.
- Brown, W. L., T. Eisner, and R. H. Whittaker. 1970. Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. *BioScience* 20:21–22.
- Burks, R. L., and D. M. Lodge. 2002. Cued in: advances and opportunities in freshwater chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology* 28:1881–1897.
- Dawidowicz, P., and C. J. Loose. 1992. Metabolic costs during predator-induced diel vertical migration of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 37:1589–1595.
- DeMott, W. R., and B. J. Pape. 2005. Stoichiometry in an ecological context: Testing for links between *Daphnia* P-content, growth rate and habitat preference. *Oecologia* 142:20–27.
- Dodson, S. I. 1988. The ecological role of chemical stimuli for the zooplankton: predator avoidance behavior in *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 33:1431–1439.
- Doksaeter, A., and J. Vijverberg. 2001. The effects of food and temperature regimes on life-history responses to fish kairomones in *Daphnia hyalina* × *galeata*. *Hydrobiologia* 442:207–214.
- Elser, J. J., W. J. O'Brien, D. R. Dobberfuhl, and T. E. Dowling. 2000. The evolution of ecosystem processes: growth rate and elemental stoichiometry of a key herbivore in temperate and arctic habitats. *Journal of Evolutionary Biology* 13:845–85.
- Forward, R. B., and D. Rittschof. 1999. Brine shrimp larval photoresponses involved in diel vertical migration: activation by fish mucus and modified amino sugars. *Limnology and Oceanography* 44:1904–1916.
- Geller, W., and H. Müller. 1981. The filtration apparatus of Cladocera: filter mesh-sizes and their implications on food selectivity. *Oecologia* 49:316–321.
- Gilbert, J. J. 1966. Rotifer ecology and embryological induction. *Science* 151:1234–1237.
- Gilbert, J. J. 1980. Further observations on developmental polymorphism and its evolution in the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Freshwater Biology* 10:281–294.
- Gliwicz, Z. M. 1969. Studies on the feeding of pelagic zooplankton in lakes with varying trophy. *Ekologia Polska* 17:63–708.
- Gliwicz, Z. M. 1990. Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature* 343:638–640.
- Gliwicz, Z. M., and P. Maszczyk. 2007. *Daphnia* growth is hindered by chemical information on predation risk at high but not at low food levels. *Oecologia* 150:706–715.
- Gliwicz, Z. M., P. Maszczyk, and W. Uszko. 2012. Enhanced growth at low population density in *Daphnia*: the absence of crowding effects or relief from visual predation? *Freshwater Biology* 57:1166–1179.
- Gophen, M., and W. Geller. 1984. Filter mesh size and food particle uptake by *Daphnia*. *Oecologia* 64:408–412.
- Hays, G. C., H. Kennedy, and B. W. Frost. 2001. Individual variability in diel vertical migration of a marine copepod: why some individuals remain at depth when others migrate. *Limnology and Oceanography* 46:2050–2054.
- Havel, J. E. 1987. Predator-induced defenses: a review. Pages 263–278 in W. C. Kerfoot and A. Sih, editors. *Predation: direct and indirect impacts on aquatic communities*. University Press of New England, Hanover, New Hampshire, USA.
- Hessen, D. O., and T. Andersen. 1990. Bacteria as a source of phosphorus for zooplankton. *Hydrobiologia* 206:217–223.
- Hessen, D. O. and E. Van Donk. 1993. Morphological changes in *Scenedesmus* induced by substances released from *Daphnia*. *Archiv für Hydrobiologie* 127:129–140.
- Iwabuchi, T., and J. Urabe. 2010. Phosphorus acquisition and competitive abilities of two herbivorous zooplankton, *Daphnia pulex* and *Ceriodaphnia quadrangula*. *Ecological Research* 25:619–627.
- Iwabuchi, T., and J. Urabe. 2012. Food quality and food threshold: implications of food stoichiometry to competitive ability of herbivore plankton. *Ecosphere* 3:51.
- Jeyasingh, P. D., and L. J. Weider. 2005. Phosphorus



- availability mediates plasticity in life-history traits and predator-prey interactions in *Daphnia*. *Ecology Letters* 8:1021–1028.
- Kats, L. B., and L. M. Dill. 1998. The scent of death: chemosensory assessment of predation risk by prey animals. *Ecoscience* 5:361–394.
- Koza, V., and V. Kořínek. 1985. Adaptability of the filtration screen in *Daphnia*: another answer to the selective pressure of the environment. *Ergebnisse der Limnologie* 21:193–198.
- Kuhlmann, H. W., J. Kusch, and K. Heckmann. 1999. Predator induced defenses in ciliated protozoa. Pages 142–159 in R. Tollrian and C. D. Harvell, editors. *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Kusch, J., and K. Heckmann. 1992. Isolation of the Lembadion-factor, a morphogenetically active signal, that induces Euplotes cells to change from their ovoid form into a larger lateral winged morph. *Developmental Genetics* 13:241–246.
- Lampert, W. 1994. Phenotypic plasticity of the filter screens in *Daphnia*: adaptation to a low food environment. *Limnology and Oceanography* 39:997–1006.
- Lampert, W., and H. Brendelberger. 1996. Strategies of phenotypic low-food adaptation in *Daphnia*: Filter screens, mesh sizes, and appendage beat rates. *Limnology and Oceanography* 41:216–223.
- Larsson, P., and S. Dodson. 1993. Invited review chemical communication in planktonic animals. *Archiv für Hydrobiologie* 129:129–155.
- Lass, S., and P. Spaak. 2003. Chemically induced anti-predator defenses in plankton: a review. *Hydrobiologia* 491:221–236.
- Law, J. H., and F. E. Regnier. 1971. Pheromones. *Annual Review of Biochemistry* 40:533–548.
- Leibold, M. A., and A. J. Tessier. 1991. Contrasting patterns of body size for *Daphnia* species that segregate by habitat. *Oecologia* 86:342–348.
- Lima, S. L., and L. M. Dill. 1990. Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology* 68:619–640.
- Loose, C. J., E. Von Elert, and P. Dawidowicz. 1993. Chemically induced diel vertical migration in *Daphnia*: a new bioassay for kairomones exuded by fish. *Archiv für Hydrobiologie* 126:329–337.
- Lynch, M., and R. Ennis. 1983. Resource availability, maternal effects, and longevity. *Experimental Gerontology* 18:147–165.
- Macháček, J. 1991. Indirect effect of planktivorous fish on the growth and reproduction of *Daphnia galeata*. *Hydrobiologia* 225:193–197.
- Macháček, J. 1993. Comparison of the response of *Daphnia galeata* and *Daphnia obtusa* to fish-produced chemical substance. *Limnology and Oceanography* 38:1544–1550.
- Murphy, J., and J. P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27:31–36.
- Ozaktas, T. 2007. Multiple antibiotic resistance of surface mucus dwelling bacterial populations in freshwater fish. Thesis. Middle East Technical University, Ankara, Turkey.
- Pauwels, K., R. Stoks, and L. De Meester. 2010. Enhanced antipredator defence in the presence of food stress in the water flea *Daphnia magna*. *Functional Ecology* 24:322–329.
- Pernthaler, J., T. Posch, K. Šimek, J. Vrba, R. Amann, and R. Psenner. 1997. Contrasting bacterial strategies to coexist with a flagellate predator in an experimental microbial assemblage. *Applied and Environmental Microbiology* 63:596–601.
- Pohnert, G., M. Steinke, and R. Tollrian. 2007. Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 22:198–204.
- Porter, K. G., and Y. S. Feig. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25:943–948.
- Psenner, R. 1993. Determination of size and morphology of aquatic bacteria by automated image analysis. Pages 339–345 in P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. J. Cole, editors. *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis, Boca Raton, Florida, USA.
- Reede, T., and J. Ringelberg. 1995. The influence of a fish exudate on two clones of the hybrid *Daphnia galeata* × *hyalina*. *Hydrobiologia* 307:207–212.
- Reede, T., and J. Ringelberg. 1998. Differential life history responses of several pelagic *Daphnia* clones differing in migratory behaviour. *Aquatic Ecology* 32:245–253.
- Riessen, H. P. 1999. Predator-induced life history shifts in *Daphnia*: a synthesis of studies using meta-analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56:2487–2494.
- Ringelberg, J., and E. Van Gool. 1998. Do bacteria, no fish, produce fish kairomone? *Journal of Plankton Research* 20:1847–1852.
- Ruther, J., T. Meiners, and J. L. M. Steidle. 2002. Rich in phenomena lacking in terms: A classification of kairomones. *Chemoecology* 12:161–167.
- Sakwinska, O. 2002. Response to fish kairomone in *Daphnia galeata* life history traits relies on shift to earlier instar at maturation. *Oecologia* 131:409–417.
- Sakwinska, O., and P. Dawidowicz. 2005. Life history strategy and depth selection behavior as alternative antipredator defenses among natural *Daphnia hyalina* populations. *Limnology and Oceanography* 50:1284–1289.
- Spaak, P., J. Vanoverbeke, and M. Boersma. 2000.

- Predator-induced life-history changes and the coexistence of five taxa in a *Daphnia* species complex. *Oikos* 89:164–174.
- Spitze, K. 1991. *Chaoborus* predation and life-history evolution in *Daphnia pulex*: temporal pattern of population diversity, fitness, and mean-life history. *Evolution* 45:82–92.
- Spitze, K. 1992. Predator-mediated plasticity of prey life history and morphology: *Chaoborus americanus* predation on *Daphnia pulex*. *American Naturalist* 139:229–247.
- Sterner, R. W., and D. O. Hessen. 1994. Algal nutrient limitation and the nutrition of aquatic herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25:1–29.
- Sterner, R. W., and J. J. Elser. 2002. Ecological stoichiometry: the biology of elements from molecules to the biosphere. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Stibor, H., and J. Luning. 1994. Predator-induced phenotypic variation in the pattern of growth and reproduction in *Daphnia hyalina* (Crustacea: Cladocera). *Functional Ecology* 8:97–101.
- Stibor, H. 1992. Predator induced life-history shifts in a freshwater Cladoceran. *Oecologia* 92:162–165.
- Tollrian, R. 1995. Predator-induced morphological defences: costs, life history shifts, and maternal effects in *Daphnia pulex*. *Ecology* 76:1691–1705.
- Tollrian, R., and D. Harvell. 1999. The ecology and evolution of inducible defenses. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Vanni, M. J. 1987. Effects of food availability and fish predation on a zooplankton community. *Ecological Monographs* 57:61–88.
- Vijverberg, J., and M. Vos. 2006. Predator-released compounds, ambient temperature and competitive exclusion among differently sized *Daphnia* species. *Freshwater Biology* 51:756–767.
- Vinyard, G. L., and W. J. O'Brien. 1976. Effects of light and turbidity on the reactive distance of bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33:2845–2849.
- Walls, M., H. Caswell, and M. Ketola. 1991. Demographic costs of *Chaoborus*-induced defenses in *Daphnia pulex*. *Oecologia* 87:43–50.
- Weber, A. 2001. Interactions between predator kairomone and food level complicate the ecological interpretation of *Daphnia* laboratory results. *Journal of Plankton Research* 23:41–46.
- Weetman, D., and D. Atkinson. 2002. Antipredator reaction norms for life history traits in *Daphnia pulex*: dependence on temperature and food. *Oikos* 98:299–307.
- Weider, L. W., and J. Pijanowska. 1993. Plasticity of *Daphnia* life histories in response to chemical cues from predators. *Oikos* 67:385–392.
- Weinhold, A., and T. Baldwin. 2011. Trichome-derived O-acyl sugars are a first meal for caterpillars that tags for predation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108:7855–7859.
- Wiackowski, K., and M. Szkarlat. 1996. Effects of food availability on predator-induced morphological defense in the ciliate *Euplotes octocarinatus*. *Hydrobiologia* 321:47–52.
- Yasumoto, K., A. Nishigami, M. Yasumoto, F. Kasai, Y. Okada, T. Kusumi, and T. Ooi. 2005. Aliphatic sulfates released from *Daphnia* induce morphological defense of phytoplankton: isolation and synthesis of kairomones. *Tetrahedron Letters* 46:4765–4767.

## **VI.6. Załącznik 6**

Bartosiewicz M., Jabłoński J., Kozłowski J. i Maszczyk P. 2015 – Brood space limitation of reproduction may explain growth after maturity in differently sized *Daphnia* species – Journal of Plankton Research. 37: 417–428.



J. Plankton Res. (2015) 0(0): 1–12. doi:10.1093/plankt/fbu108

# Brood space limitation of reproduction may explain growth after maturity in differently sized *Daphnia* species

MACIEJ BARTOSIEWICZ<sup>1,2</sup>, JĘDRZEJ JABŁOŃSKI<sup>3</sup>, JAN KOZŁOWSKI<sup>4</sup> AND PIOTR MASZCZYK<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>DEPARTMENT OF HYDROBIOLOGY, BIOLOGICAL AND CHEMICAL RESEARCH CENTRE, UNIVERSITY OF WARSAW ŻWIRKI I WIGURY 101, WARSAW 02-089, POLAND,

<sup>2</sup>GROUPE DE LA RECHERCHE INTERUNIVERSITAIRE EN LIMNOLOGIE ET EN ENVIRONNEMENT AQUATIQUE, VINCENT-D'INDY 90, MONTREAL H2V 2S9, CANADA,

<sup>3</sup>INSTITUTE OF APPLIED MATHEMATICS AND MECHANICS, UNIVERSITY OF WARSAW BANACHA 2, WARSAW 02-097, POLAND AND <sup>4</sup>INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL SCIENCES, JAGIELLONIAN UNIVERSITY, GRONOSTAJOWA 7, KRAKÓW 30-387, POLAND

\*CORRESPONDING AUTHOR: p.maszczyk@uw.edu.pl

Received July 2, 2014; accepted December 4, 2014

Corresponding editor: Beatrix E. Beisner

Our aim was to determine if a limitation of reproduction by available brood chamber space could explain indeterminate growth in *Daphnia*, and what conditions might affect this. We evaluated the brood chamber volumes of the larger *Daphnia longispina* and smaller *D. cucullata* species during the first three clutches of eggs and compared this with the volume of eggs produced in low and high food conditions. We also examined whether these *Daphnia* retained significant levels of unused lipids in their bodies after reproduction, and if the volume of eggs deposited in brood chambers of different capacities corresponded to the maximal egg volume specified by a geometrical model. Our results revealed that, at least during the early clutches, both *Daphnia* species produced as many eggs as permitted by the available brood chamber volume in both high and low food conditions, thus indicating that “brood space constraint” can explain the simultaneous investment in growth and reproduction. The detailed evaluation of this hypothesis required not only brood chamber volume assessment, but also consideration of the effect of egg size on packing efficiency, especially in low food conditions and for the smaller *Daphnia* species. The significant lipid reserves detected in the *Daphnia* body after reproduction also support the limitation of reproduction by brood chamber volume, particularly in larger species.

**KEYWORDS:** *Daphnia*; egg size; indeterminate growth; resource allocation; trade-off

## INTRODUCTION

At the onset of reproduction, an animal either ceases to grow and allocates all accumulated resources (or surplus

energy; Kozłowski, 1991) to reproduction (“bang-bang” on/off switch in resource allocation leading to determinate growth) or continues to grow while investing a proportion



of its resources to reproduction (intermediate resource allocation leading to indeterminate growth; Cohen, 1971; Heino and Kaitala, 1996). The majority of life history models suggest that determinate growth is optimal in aseasonal environments (Kozłowski, 1992; Perrin and Sibly, 1993), and should also occur in a seasonal environment if the organism's lifespan is short in relation to the season length. In spite of this prediction, a majority of species from different systematic groups have indeterminate growth (e.g. Sebens, 1987), which calls for an explanation. Seasonality explains such a pattern of growth in long-lived animals, such as fish, reptiles and large crustaceans, if their lifespans cover many seasons (Kozłowski and Teriokhin, 1999; Kozłowski, 2006). The same explanation should not be extended to short-lived animals such as *Daphnia*.

In an aseasonal environment or in short-lived animals in a seasonal environment, it may be optimal that a period of pure growth may be followed by a period of mixed growth and reproduction (so-called 'singular arc', Perrin and Sibly, 1993) with a switch to pure reproduction after reaching a certain size. Such a strategy may maximize reproductive output when both mortality and production increase or decrease with size (Perrin, 1992). However, a simultaneous increase of both production and mortality rates with body size is not the only condition for the "singular arc" to occur, other mechanisms may be involved. Some complex models, either general (Engen and Sæther, 1994; Gurney and Middleton, 1996) or tailored for *Daphnia* (Taylor and Gabriel, 1992; Fiksen, 1997) predict an intermediate allocation of resources. The stochasticity, or irregularity, of an environment causes the preference for intermediate allocation in Gurney and Middleton's model (1996). "Singular arc" may explain Engen and Sæther's (Engen and Sæther, 1994) and Fiksen's (Fiksen, 1997) results, but the structure of their models does not allow for a definitive conclusion. Taylor and Gabriel's (Taylor and Gabriel, 1992) results contrast with Perrin's (Perrin, 1992) theoretical findings, suggesting that the specific functions used in their model were the cause.

Other explanations for intermediate resource allocation patterns include the constraint imposed by the maximum possible growth rate of developing embryos (Kozłowski and Ziółko, 1988 with correction by Ioslovich and Gutman, 2005), or the limitation by the space available for carrying eggs, e.g. in fish, clams and cladocerans (Myers and Doyle, 1983; Perrin *et al.*, 1987; Heino and Kaitala, 1996). The constraint of reproductive effort by body size, i.e. brood space, previously reported in freshwater amphipods (Glazier, 2000), bivalves (Sebens, 1987; Beekey and Hornbach, 2004), starfish (Strathmann *et al.*, 1984) and gastropods (Chaparro *et al.*, 2001), may prevent the organism from investing all available resources in reproduction,

thus reducing the feasibility of a "bang-bang" strategy (Perrin *et al.*, 1987).

In planktonic animals such as Cladocerans (e.g. *Daphnia* or *Simocephalus* sp.) that deposit eggs into a brood chamber, both the "singular arc" (Perrin and Sibly, 1993) and the "size constraint" hypotheses (Perrin *et al.*, 1987) may provide an explanation for intermediate resource allocation. While the first is possible because both production (*sensu* Lynch *et al.*, 1986) and mortality (particularly in the presence of a visually hunting predator, e.g. planktivorous fish, Zaret, 1980) may increase with size, the second theory is also possible as the volume of the brood chamber may not be sufficient to hold all the eggs that could be produced. To our knowledge, there has only been one previous example of an experimental test of the latter hypothesis (Perrin, 1989). This test revealed that identically sized individuals of *Simocephalus* sp. allocated relatively less to reproduction at lower food levels compared with higher ones, thus suggesting that reproduction was limited by resources rather than by body size. The authors claimed to effectively refute the "size constraint" hypothesis in planktonic animals on this basis, but their claim must be treated with caution as the brood spaces of the organisms were not measured. It is necessary to directly measure brood chamber space rather than body size when testing the "size constraint" hypothesis experimentally. Firstly, the relationship between brood chamber volume and body size can depend on environmental factors such as food conditions (Glazier, 1992; Beekey and Karlson, 2003), and secondly, the efficiency of egg packing in the brood chamber can depend on the size of eggs, which itself is a highly plastic trait. Egg size depends on various factors such as temperature (Perrin, 1988; Senerpont Domis *et al.*, 2013), predation (Guisande and Gliwicz, 1992), maternal body size (Lampert, 1993), population density (Burns, 1995; Gliwicz *et al.*, 2012), food quality (Boersma and Kreutzer, 2002) and quantity (Lynch, 1989; Glazier, 1992).

Here, the "brood space constraint" hypothesis was tested by verifying if, and under what conditions, identically sized individuals invest the same amount of resources in reproduction irrespective of food concentration. A simple model was constructed to calculate the optimal packing of the given brood chamber space. As the efficiency of resource acquisition and the size of eggs tend to be body size specific in cladocerans (Gliwicz, 1990; Dudycha and Lynch, 2005), reproductive investment may also vary in species of different size. Therefore, we accounted for differences in the size of eggs at different food levels and between species of various sizes. However, it is also possible that the available brood chamber space is ultimately well adapted to the potential of egg production dependent on food levels, and so the

brood chamber may be full but not constraining reproductive investment. To address such a possibility in our study, the lipid reserves in the body were measured before and after reproduction. It is unlikely that a species so strongly endangered by predation would leave substantial amount of reserves to be invested in later reproduction if the current investment is not constrained.

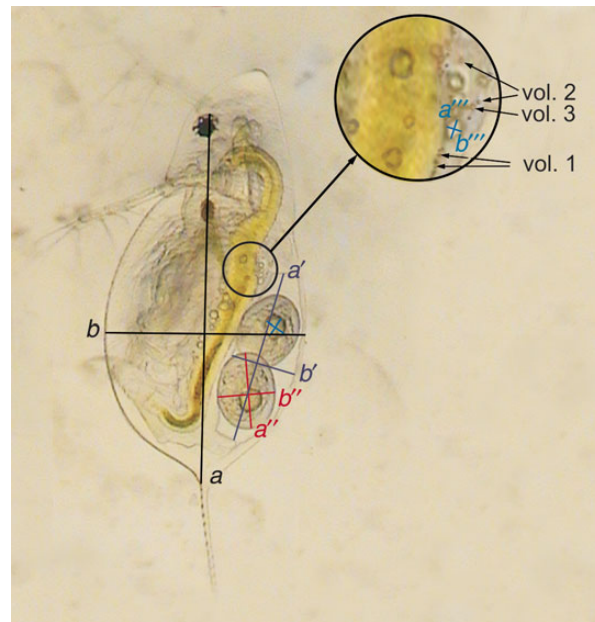
The aim of this study was to evaluate if, and under what conditions, reproductive investment in *Daphnia*, is limited by the volume of the brood chamber. This hypothesis was tested by determining whether the clutch volume in two species of *Daphnia* (larger *D. longispina* and smaller *D. cucullata*), grown at two algal food levels (0.1 and 1.0 mg C L<sup>-1</sup>), was independent of feeding conditions, and by comparing the observed investment in reproduction with the predictions of a geometrical model of maximal egg packing. This study also included the additional analysis of the relative levels of ovary lipids remaining in the *Daphnia* body after producing each clutch of eggs.

## METHOD

### Experimental design

The experiment was performed using *D. longispina* (clone HG011, Lake Świącay, Poland) and *D. cucullata* (clone C006, Lake Tjeukemeer, The Netherlands) originating from the second clutch of fourth-brood females from long established synchronized laboratory cultures. These cultures were maintained in aged (14 days), aerated and 2.0- $\mu$ m-filtered lake water in 4-L jars, and fed daily with *Scenedesmus obliquus* at a concentration above the incipient food level (1.0 mg C L<sup>-1</sup>). The experiment commenced with the distribution of 160 synchronized neonates (0–6 h after birth, 80 per species) individually into separate 100-mL experimental beakers held in a water bath at 20°C and illuminated with a 16-h light:8-h dark photoperiod. The experimental beakers contained 90 mL of filtered lake water supplemented with *Scenedesmus* to produce low (0.1 mg C L<sup>-1</sup>) and high (1.0 mg C L<sup>-1</sup>) algal food levels (40 individuals per food treatment). The low level of food allowing the growth of juveniles and some egg production while the high level facilitating maximum egg production in both *D. longispina* and *D. cucullata*, (Gliwicz and Maszczyk, 2007; Maszczyk and Bartosiewicz, 2012). The carbon content of the algal suspension was calculated from a calibration curve relating organic carbon to absorbance at 800 nm.

During the experiment, the animals were individually cultured until the third adult instar and the media replaced every 16 h to avoid any significant changes in



**Fig. 1.** The scheme of axis measurements of the body (length,  $a$  and height,  $b$ ), brood chamber (length,  $a'$  and height,  $b'$ ), and an egg (length,  $a''$  and height,  $b''$ ), as well as of the lipid droplets in eggs and remaining in the body after reproduction ( $a'''$  and  $b'''$ ). The total volume of lipids in the body was calculated as the sum of droplets larger than 520  $\mu\text{m}^3$  that were individually counted and measured as well as smaller droplets that were counted and assigned to one of the three size classes:  $<65 \mu\text{m}^3$  (vol. 1),  $65 < x < 220 \mu\text{m}^3$  (vol. 2) and  $220 < x < 520 \mu\text{m}^3$  (vol. 3). The total volume of the lipid droplets assigned to these classes did not exceed 5% of their total volume in the body.

algal food levels and bacterial numbers (Maszczyk and Bartosiewicz, 2012). When necessary, a night-vision device was used at times of media replacement (as in Gliwicz et al., 2012). The *Daphnia* were examined for eggs every 8 h until the third clutch of eggs. During the first, second and third clutch (0–8 h after eggs had been laid into the brood chamber), each individual was photographed from the lateral side under a dissecting microscope. Three randomly chosen individuals from each treatment were also photographed from the dorsal side. Using MultiScan image analysis software (Computer Scanning Systems) to analyse the photographs, each *Daphnia* was measured from the top of the eye to the base of the tail spine (Fig. 1). The dimensions of the half-ellipsoidal brood chamber were also measured (Fig. 1) and its volume was calculated according to the formula  $4/3\pi \times 1/2a \times 1/2b \times 1/2c$ , where  $a$  stands for the length,  $b$  the height and  $c$  the width in the middle of the brood chamber. The length and height of each *Daphnia* and each brood chamber were measured in the photographs in which the *Daphnia* was positioned on the lateral side (Fig. 1). The width of the brood chamber was calculated using the mean ratio of length and width of the brood chamber taken from the measured animals in a

given treatment. The eggs produced at each reproduction were counted and the mean volume of eggs in the brood chamber was calculated using a formula similar to that employed for brood chamber volume evaluation but assuming an ellipsoidal shape for each egg (only the length and height were measured, Fig. 1, and width was assumed to equal the height of an egg).

The reproductive investment per individual ( $R$ ) was calculated by multiplying the number of eggs by the mean volume of an egg. Furthermore, since Glazier (Glazier, 2000) suggested a strong relationship between the quantity of body lipids and the size of eggs or embryos produced, it may be assumed that a large amount of lipid droplets (Tessier and Goulden, 1982) remaining in the body after reproduction may also indirectly indicate limitation of reproductive investment by the space available for carrying eggs. Therefore, the total volume of lipid droplets in the body at the time of reproduction was calculated as the sum of the single ellipsoidal droplets observed in each clutch of eggs, plus the number of droplets remaining in the body. The length and height were measured for each droplet larger than  $520 \mu\text{m}^3$ . The volume of remaining droplets was calculated after assignment to one of the three size classes (Fig. 1). The total volume of lipid droplets remaining in the body after all of the eggs had been deposited into the brood chamber represents energy reserves that were not invested in reproduction.

## Model description

A simplified geometrical model was constructed to predict how many eggs can be packed into the brood chamber. Due to the complexity of the problem of optimal packing the following simplified parameters were used: (i) all eggs in a clutch were considered spherical and equal in size, and the brood chamber half-ellipsoidal in shape, (ii) optimal packing results from inserting eggs one-by-one for as long as possible starting from the bottom of the brood chamber and (iii) a consecutive egg can be placed in the brood chamber if the distance from its centre to the surface of the chamber is greater than its radius. The packing scheme is invariant with respect to the scaling of both the chamber and the egg volume, takes into account a possible 5–10% stretching of the brood chamber and ignores the variation of egg size within clutches. When interpreting the modelled results, one needs to consider that the positioning of the eggs in the brood chamber is controlled by abdominal processes, and movement of *Daphnia* within the carapace, as well as flexibility of the brood chamber itself, may help to accommodate eggs and secure their sufficient ventilation. Due to the fact that some empty space must be left to allow for such movements, the estimation of the space within the model is

slightly biased toward higher values, and thus is conservative with respect to the tested hypothesis.

## Data analysis

The general linear model method comparison of the slopes and intercepts of regression lines was used to test for an effect of food concentration on the following four relationships: (i) clutch volume (reproductive investment,  $R$ ) on body length ( $L$ ), (ii) chamber volume on  $L$ , (iii)  $R$  on chamber volume and (iv) number of eggs per clutch on chamber vol./egg vol. Chamber volume to egg volume ratio can be interpreted as the number of eggs that could fit into the chamber if 100% efficient packing was possible (irrespective of egg size). All relationships were examined in *D. longispina* and *D. cucullata* using pooled data from the first three clutches, and from each clutch separately with, respectively,  $L$ , chamber volume and chamber vol./egg vol. as covariates (Table I). Independent variables were transformed by  $y = a(x - x_0)^b$ , as proposed by Perrin (Perrin, 1989), to linearize each of the covariates prior to statistical analysis, where  $x$  is body length in the analysis (i) and (ii), chamber volume in (iii) and chamber vol./egg vol. in (iv) and  $y$  is a transformed variable. Parameters  $a$ ,  $x_0$  and  $b$  were calculated for each relationship (i)–(iv) using AMPL software by minimizing the mean squared distance between the data and the model line. The values of the parameters are given in the Supplementary data, Table A1. In the analysis of difference between food-level treatments, the data at high food concentration were used as a reference. Therefore, the parameters of the model line were fitted to reflect a high food level and were used as transformation parameters of independent variables in both (low and high) food concentrations.

A three-way ANOVA was used to test the effect of food level (1.0 and 0.1 mg C L<sup>-1</sup>), the order of the clutch (first, second and third), the species (*D. longispina* and *D. cucullata*) and the interaction between these factors on the egg volume, brood chamber volume divided by egg volume (as a proxy of brood space availability) and the percentage of lipids remaining in the body after reproduction. The ANOVA was followed by Tukey's *post hoc* test. Statistical analyses were performed using Statistica (StatSoft) 9.0 software.

The difference between the number of eggs in the brood chamber and the number that the brood chamber can maximally contain according to the packing model was evaluated using the mean absolute deviation between the modelled and observed number of eggs,  $\text{MAE} = n^{-1} \times \sum |T_i - P_i|$ , where  $T_i$  is the number of eggs and  $P_i$  is the value predicted from the model for the animal  $i$ . For each dataset with  $\text{MAE} < 1.0$  (the mean absolute difference between the model and the experiment

Table I: Comparison (F, P, df) of the intercept (elevation) with a y-axis of regressions (significant differences in slope, precluding comparisons of intercepts, were marked as #)—at high and low algal food levels—of reproductive investment (R) on power transformed body length (L), chamber volume on power transformed L, reproductive investment on power transformed chamber volume and clutch size on power transformed chamber volume/egg volume, in *D. longispina* and *D. cucullata* for the pooled data from the first three clutches (+4 h after egg deposition, clutch 1st–3rd), and each clutch separately (1st, 2nd and 3rd, respectively)

Clutch Relationship	<i>D. longispina</i>						<i>D. cucullata</i>					
	1st–3rd		1st		2nd		1st–3rd		1st		2nd	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
R on L	48.1	***	18.8	***	11.3	**	19.3	***	0.0	NS	19.0	***
Chamber vol. on L	a		9.7	**	20.2	***	6.9	***	a		19.3	***
R on chamber vol.	0.2	NS	3.0	NS	1.0	NS	15.0	***	4.6	*	1.0	NS
Egg number on chamber vol./egg vol.	12.0	***	3.3	NS	16.1	***	28.7	***	2.2	NS	4.3	*

Degrees of freedom: 1st–3rd, 1.15; 1st, 1.47; 2nd, 1.50; 3rd, 1.47 in *D. longispina*; and 1st–3rd, 1.16; 1st, 1.56; 2nd, 1.51; 3rd, 1.43 in *D. cucullata*.

The functions used for power data transformation of independent variables before linear regression analysis have the same general formula ( $y = a(x - x_0)^b$ ), but different values of the parameters ( $a$ ,  $x_0$  and  $b$ ) for each relationship (Supplementary data, Table A1).

<sup>a</sup>Slopes are different, and thus significance of the intercept is irrelevant.

Statistical significance was accepted at \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$  or \*\*\* $P < 0.0005$ . NS indicates no significance.

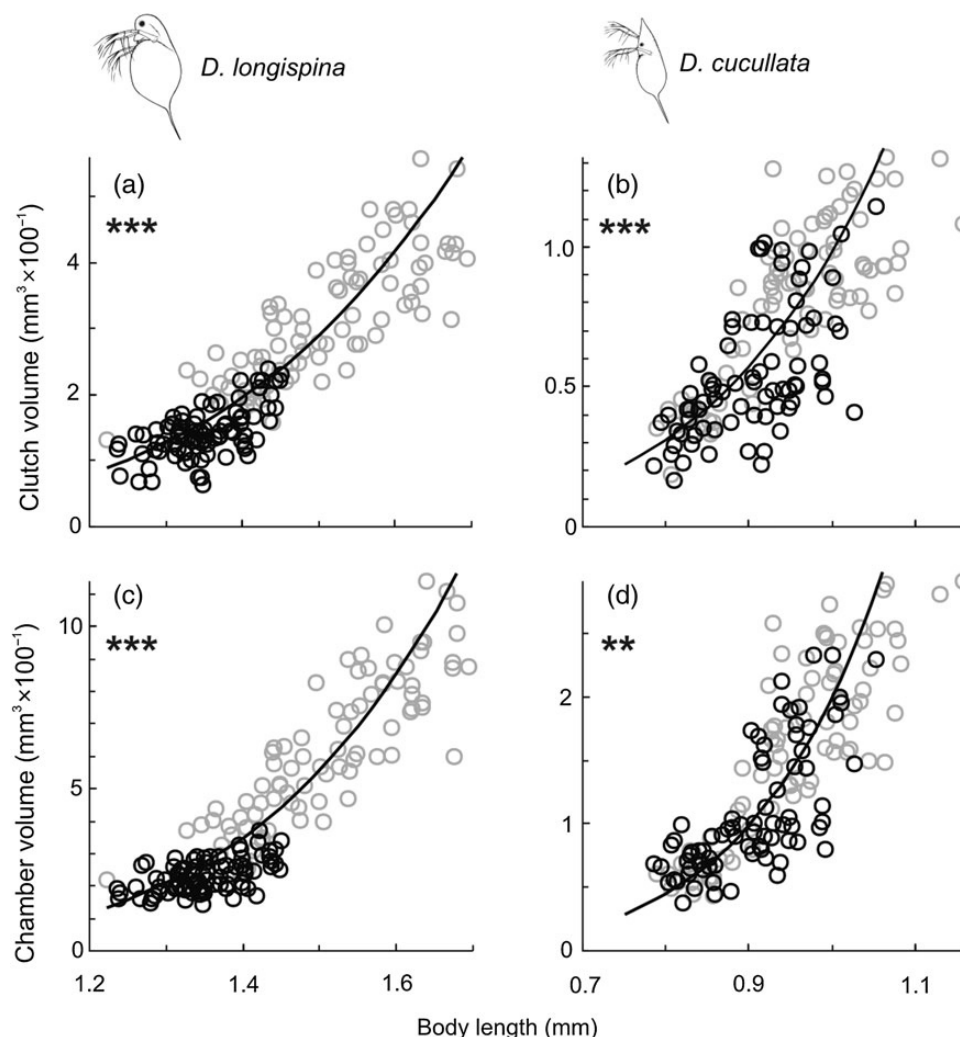
is less than one egg), it was concluded that the reproductive investment was limited by the volume of the brood chamber, rather than by food availability, unless the brood chamber is exactly adjusted to the clutch volume. The number of samples for which  $T_i - P_i$  was negative, a result of the simplified assumptions on chamber geometry, did not exceed 5% in any of the datasets analysed and each of them was rounded up to 0.

## RESULTS

In both *D. longispina* and *D. cucullata*, the reproductive investment measured as clutch volume ( $R$ ) on body length was greater at the high food level than at the low level (Table I, Fig. 2a and b). This was true for the pooled data and for the data from each clutch of eggs analysed separately. The chamber volume on body length relationship was also stronger at the high food level for both *Daphnia* species for the pooled data (Fig. 2c and d) and for the data from each separate clutch of eggs (Table I, excluding third clutch in *D. cucullata*). Comparison of the regressions of clutch volume ( $R$ ) on chamber volume at the high and low food levels did not reveal any significant difference in *D. longispina*, neither for the pooled data nor for the data from each clutch analysed separately (Table I, Fig. 3). For the smaller species, this relationship was significantly different only for the pooled data and the data from the first and third clutch separately (Table I, Fig. 3). Clutch size on chamber vol./egg vol. was greater at high food level for both *Daphnia* species except for the first clutch (Table I).

The average egg volume was larger at low food, particularly in *D. cucullata*, and in the first clutch of eggs. This volume increased in subsequent clutches, and was larger in *D. longispina* than in *D. cucullata* (Table II, three-way ANOVA, with Tukey's *post hoc* test). The relative volume of an average egg over the volume of the brood chamber was (i) larger at the low food level (Food factor), particularly for the first reproduction (Food  $\times$  Clutch) in both species, (ii) decreased in subsequent clutches (Clutch factor), particularly in *D. cucullata* (Clutch  $\times$  Species) and (iii) was larger in *D. cucullata* than *D. longispina* (Species factor, Table II, Fig. 3). The relative level of lipids remaining in the body to total lipids in the body and eggs after each egg-laying was greater at the high food level (Food factor) and greater in *D. cucullata* than *D. longispina* (Species factor; Food  $\times$  Species, three-way ANOVA, Table II, with Tukey's *post hoc* test, Fig. 4). The level of lipid droplets also decreased in each clutch of eggs (Clutch factor) but this effect was greater in *D. cucullata* than *D. longispina* (Clutch  $\times$  Species interaction). The between-food concentration differences in lipid levels remaining in the body after reproduction





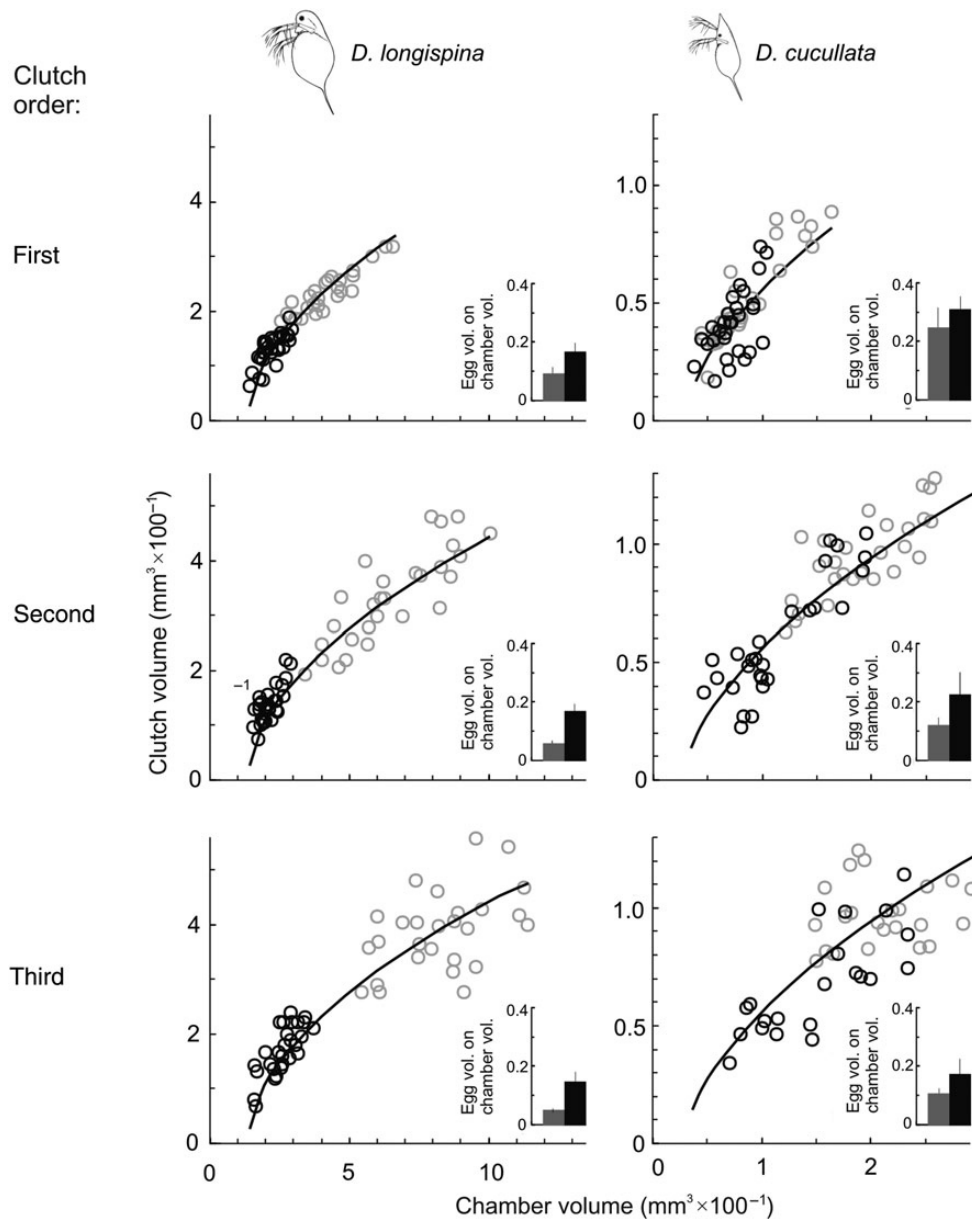
**Fig. 2.** The relationship between clutch volume and body length (**a** and **b**), as well as brood chamber volume and body length (**c** and **d**) in data plotted from the first three clutches of *D. longispina* (**a** and **c**) and *D. cucullata* (**b** and **d**) at a high food level (grey circles, and black regression line) and a low food level (black circles, line not showed). Each regression line was fitted to the data from the high food level as a power type function  $y = a(x - x_0)^b$  with parameters calculated to minimize mean square errors on both the *x*- and *y*-axes (Supplementary data, Table A1). Statistical significance was accepted at \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.005 or \*\*\**P* < 0.0005. NS indicates no significance.

became greater from the first to the third reproduction (Food × Clutch interaction).

While 100% of *D. longispina* survived to the third clutch in each treatment, in *D. cucullata* this was the case only at the high food level. At the low food concentration, only 51% of *D. cucullata* survived to the end of the experiment due to mortality occurring between the 2nd and 4th day of their life. This mortality was well correlated with the level of lipid reserves, which dropped to minimal values at this time (Maszczyk and Bartosiewicz, 2012). The time between the 2nd and 4th days of life (2nd to 3rd pre-adult instar) can be considered the threshold age (instar) in *D. cucullata*, at which the maternal lipids have been completely depleted and only individuals that are already able

to efficiently feed on the available food survive to the next instar.

The difference between the number of eggs observed in the brood chamber and the maximal number of eggs that can theoretically be packed in the brood chamber according to the model was generally lower at the high food level, and increased in subsequent clutches in both *Daphnia* species (Table III, Fig. 4). In the first clutch of eggs, the mean absolute errors (MAE) were <1 in both *Daphnia* species at both food levels (Table III), in the second clutch, they were <1 in both *Daphnia* species only at the low food level, and in the third clutch, a value below 1 was only found in *D. longispina* at the low food level (Table III).



**Fig. 3.** The relationship between clutch volume and brood chamber volume (large panels) at a high food level (grey circles and black regression lines) and a low food level (black circles), and egg volume over brood chamber volume (small panels) at high (grey bars) and low (black bars) food levels, in the first, second and third clutch of *D. longispina* and *D. cucullata*. Regression lines for each species represent the power type function  $y = a(x - x_0)^b$  with parameters calculated to minimize mean square errors on both the  $x$ - and  $y$ -axes for data from the high food level (Supplementary data, Table A1).

## DISCUSSION

The experiments performed in this study showed that the medium- and small-bodied *Daphnia* species commonly found in European lakes (*D. longispina* and *D. cucullata*, respectively), produce as many eggs (at least in the first clutch) as is permitted by the volume of their brood chambers, in food conditions ranging from an amount which almost limits egg production to one approaching

incipient levels (Gliwicz and Maszczyk, 2007; Maszczyk and Bartosiewicz, 2012). Despite some minor inconsistencies, the limitation of reproductive investment by the volume of the brood chamber in the first clutch was supported by three lines of evidence: first, reproductive investment was independent of feeding conditions when compared with brood chamber volume as a covariate (Fig. 3); secondly, *Daphnia* retained a significant amount of unused resources in their bodies after reproduction

*Table II: Three-way ANOVA (F and P) testing the significance of the effects of algal food (1.0 and 0.1 mg C L<sup>-1</sup>; food), the order of clutch (first, second and third; clutch no), the species (D. longispina and D. cucullata; species) on the egg volume (egg vol.), egg volume divided by brood chamber volume (egg vol. on chamber vol.) and the percentage of lipids remaining in the body after producing each clutch (remaining lipids)*

Factor; interaction	Egg vol. (mm <sup>3</sup> )		Egg vol. on chamber vol.		Remaining lipids (%)	
	F	P	F	P	F	P
Food	11.6	**	319.3	***	37.1	***
Clutch no	6.6	**	113.4	***	47.8	***
Species	1065.6	***	300.1	***	487.3	***
Food × Clutch	2.1	NS	5.6	**	7.3	**
Food × Species	4.0	*	2.8	NS	28.2	***
Clutch × Species	2.0	NS	48.2	***	3.5	*

DF for error is the same in all three analyses (330). Three-way interaction is not significant. NS indicates no significance.

Statistical significance was accepted at \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$  or

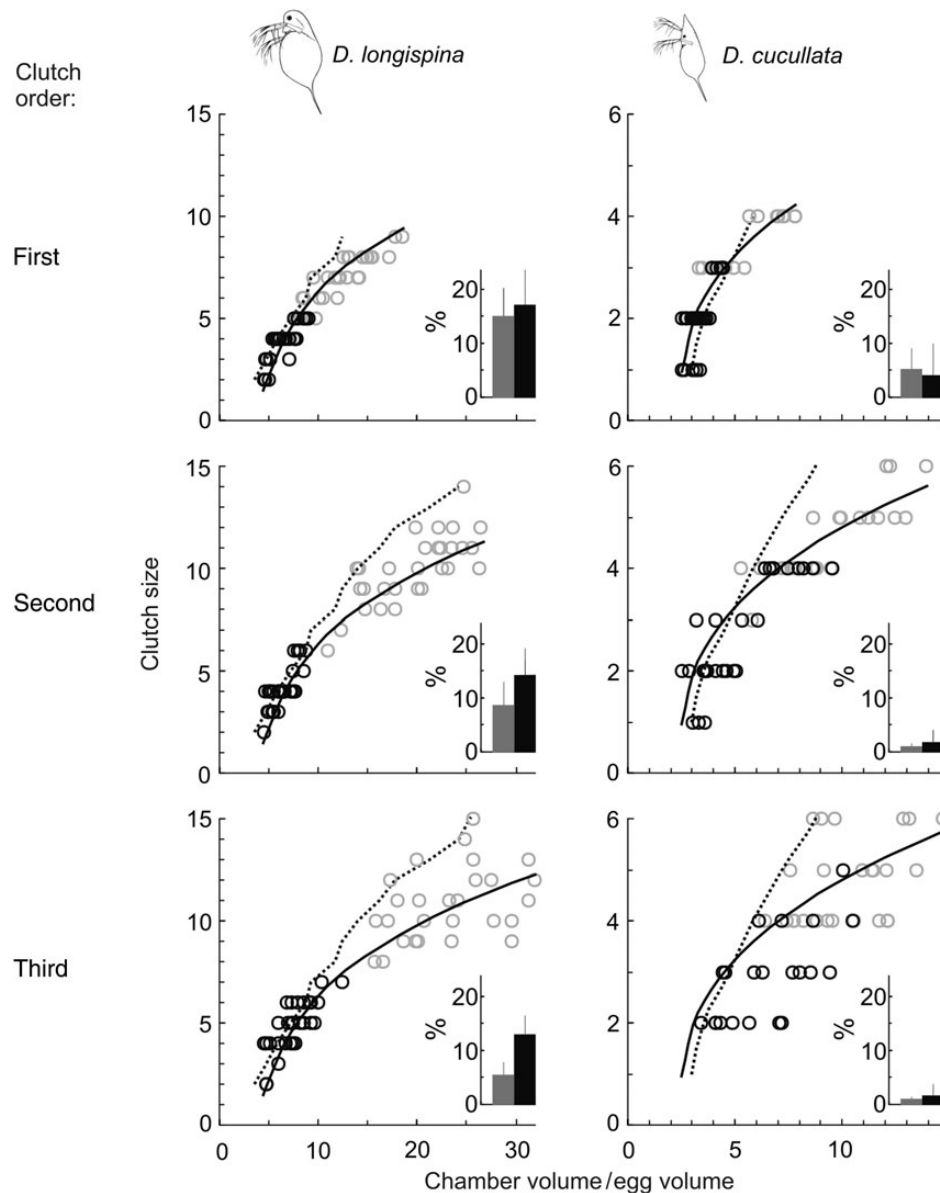
\*\*\* $P < 0.0005$ .

(Fig. 4); and thirdly, the number of eggs laid into a brood chamber of a given volume corresponded to the maximal egg volume predicted using a geometrical model at both low and high food levels (Fig. 4). Therefore, our results support the previously refuted “space constraint” hypothesis as a cause of an intermediate resource allocation in cladocerans at least during early clutches (Perrin, 1989). This hypothesis was not fully validated previously as verification requires consideration of both (i) constraint by the brood chamber volume, rather than by body length as done by Perrin *et al.* (size, Fig. 2) and (ii) egg packing efficiency due to differences in the food-dependent size of eggs (Fig. 3). While the effect of brood chamber volume provided evidence in support of the “space constraint” hypothesis in the larger *Daphnia* species (*D. longispina*), the role of egg packing efficiency was needed to support the smaller species. Reproductive investment is less limited by brood constraint during the second clutch, and possibly becomes entirely independent from the brood space in the later clutches in both smaller and larger *Daphnia*. If this is the case, reproduction appears to become limited by resources at a low food level, and possibly by some physiological (Boersma, 1995) or stoichiometric constraints (Sterner *et al.*, 1992) at high food level.

The findings of this study can be reconciled with those from experiments performed on *Simocephalus* by Perrin (Perrin, 1989). These authors showed that individuals of the same body length invest relatively less in reproduction

at low food levels compared with high levels, which suggests limitation of reproductive investment by available resources rather than by size constraint (Fig. 2a and b). However, the results obtained in the present study also reveal that animals grown at a low food level had significantly smaller brood chambers than animals of the same body length grown at a high food level (Fig. 2c and d). Thus, only the direct measurement of the brood chamber volume together with an estimation of egg size is an accurate means to validate the brood space constraint. A smaller brood chamber in relation to body length in *Daphnia* grown at a low food level may be explained as an effect of brood chamber adjustment to reproductive potential (which may indicate that the reproductive potential is limited by resources rather than brood chamber size). However, it is equally possible that this can result from the fact that the formation of more complex body structures, such as in the brood chamber, especially at limiting food conditions, may take more time and energy than simply increasing body length (developmental bottleneck effect, Sibly *et al.*, 1985). The second explanation is supported by the two lines of evidence described below.

In the larger *D. longispina*, the comparison of the relationship between clutch volume ( $R$ ) and chamber volume did not reveal any differences between the reproductive investment at high and low food levels in any of the first three clutches. In the smaller *D. cucullata*, such differences, at least at the first reproduction, were eliminated when variations in egg volume between high and low food level were taken into account (non-significant difference in clutch size on chamber volume over egg volume relationship, Table I). This shows that the brood space constraint depends not on the capacity of the brood chamber alone, but rather on the ratio between the brood chamber volume and the egg volume. This is particularly important in small *Daphnia* producing relatively large eggs that cannot be packed as efficiently as relatively smaller eggs in other *Daphnia* species (Fig. 3). Nevertheless, in small zooplankton species, the production of large eggs containing more maternal reserves can lead to a higher rate of survival for early neonates before they start to efficiently ingest and digest algal food (Goulden and Place, 1993; De Mott *et al.*, 2010). In general, embryos of small cladocerans may require more energy reserves for survival than those of larger ones (Goulden *et al.*, 1987). This is exemplified by the neonates of *D. cucullata* that rely almost solely on maternal resources for the first 2–3 days of their life (Maszczyk and Bartosiewicz, 2012). Therefore, the production of relatively large eggs by smaller *Daphnia* species seems to be the result of a trade-off between the quality and quantity of the eggs. The elevated threshold size of an egg required for neonate survival in small *Daphnia* species



**Fig. 4.** The relationship between clutch size (number of eggs in brood chamber) and brood chamber volume/egg volume (large panels) at high (grey circles and solid regression lines) and low (black circles) food levels, and as a model line representing the maximal egg packing simulation (dotted line). The relative (%) levels of lipids remaining in the body of *Daphnia* after reproduction at high (grey bars) and low (black bars) food levels is shown in small inserts. Regression lines for each species represent the power type function  $y = a(x - x_0)^b$  with parameters calculated to minimize mean square errors on both the  $x$ - and  $y$ -axes for data from the high food level (Supplementary data, Table A1).

is consistent with the results of earlier studies revealing that egg size plasticity due to environmental factors (e.g. algal and bacterial food concentration) is lower in smaller *Daphnia* species compared with that of larger ones (Maszczyk and Bartosiewicz, 2012).

The high level of unused lipids remaining in the body after eggs have been laid into the brood chamber, especially in the first clutch (Fig. 4), also supports the notion that reproductive investment in *Daphnia* is limited by space rather than resources in individuals starting to

reproduce. Furthermore, the measurement of body lipids remaining after each clutch decreased in consecutive clutches in both species, indicating that reproductive investment approaches independence, or even becomes independent, from the available brood space. The consumption of stored resources in larger *Daphnia* is quite slow in subsequent clutches, and the lipid reserves are still relatively high after the third reproduction, suggesting that reproduction is continuously constrained by the available brood space. In contrast, the sudden drop in the



*Table III: The mean absolute errors (MAE, see Method) for the differences between the number of eggs deposited into the brood chamber of individual *Daphnia*, derived from experimental data for each chamber volume/egg volume, and respective theoretical values predicted by the mathematical simulation for each of the three clutches (1st, 2nd, 3rd) for *D. longispina* and *D. cucullata* using data from low (L) and high (H) food concentrations separately*

Measurement	Clutch number	<i>D. longispina</i>		<i>D. cucullata</i>	
		L	H	L	H
MAE	1st	0.37	0.83	0.66	0.83
	2nd	0.61	2.00	0.63	1.48
	3rd	0.81	2.28	1.13	2.12

It was assumed that values <1 (in bold) indicate brood chamber volume limitation of reproductive investment in *Daphnia* (on average the remaining space in the brood chamber can accommodate less than one egg).

amount of the remaining body lipids to negligible levels in smaller *Daphnia* during the second reproduction may indicate that reproductive investment becomes independent from brood chamber constraint sooner than in larger species. The lower levels of remaining lipids at high compared with low food concentrations in larger *Daphnia* may be due to the production of smaller eggs that are more efficiently packed into the brood chamber.

The comparison of the number of eggs deposited by experimental *Daphnia* and the maximal number that could theoretically occupy a brood chamber of a given volume revealed close correspondence between the two in the first clutch at high food, and in each clutch at low food. However, in the second and third clutch during the high food level, the differences between the modelled possible number of eggs and the observed number of eggs (the value of the mean absolute error) were always higher than one egg, which implies that reproduction became independent from the limitation caused by the available brood space. Nevertheless, even in the second and third clutch, the difference between the number of eggs laid by the experimental *Daphnia* and the maximal number of eggs that could be packed into a brood chamber of given volume was almost equal to or lower than two eggs. This might be an indication that reproductive investment is continuously limited by brood space, particularly considering the paired nature of the ovaries in *Daphnia*, which may favour the production of two additional eggs instead of one even when brood space is limited (Boersma, 1995). There may be two additional alternative or complimentary explanations for the

greater differences between the theoretical and actual values for egg number: (i) the half-ellipsoid shape of the brood chamber assumed in the model is inadequate and could have led to an overestimation of the brood space available for carrying eggs, and (ii) clutch size in the second and third clutch in *D. longispina* at the high food level becomes independent from brood space, despite the high levels of lipids remaining in the body after reproduction. The latter explanation implies that when the food level is high, reproduction in the third adult instar is limited by physiological (Boersma, 1995) or stoichiometric constraints (Sterner *et al.*, 1992), rather than by space or resources.

The “space constraint” of the reproductive investment during early clutches in *Daphnia* can be regarded as a result of rapid maturation, where the brood chamber volume is insufficient to hold all the eggs that can be produced. Natural selection may favour rapid maturation at small body size in *Daphnia* if mortality increases with size (e.g. Taylor and Gabriel, 1993) and the probability of growing large enough to reproduce without space constraint is relatively low. This is likely to be the case particularly in lakes where *Daphnia* co-exists with planktivorous fish, and thus is exposed to size-selective predation and rarely survive until the second or third adult instar (e.g. Mikulski *et al.*, 2005). The present study, performed on *Daphnia* species originating from lakes known for severe fish predation (Jachner, 1991) supports the notion that reproductive investment is limited by brood space during the first three adult instars. The strong limitation of reproduction by brood space due to the early maturation and lower brood volume of *Daphnia* from lakes containing planktivorous fish should be compensated, at least in part, by the production of smaller eggs. Our findings imply, therefore, that the production of smaller eggs in the presence of fish (Stibor, 1992) may result not only from the fact that in lakes with intensive fish predation there is a lower probability that neonates will be exposed to low food conditions (Stibor and Muller-Navarra, 2000), but also from the need to cope with brood space limitation when maturing earlier. These two explanations, however, are not mutually exclusive.

Accelerated egg production may also lead to a reduction in reproductive investment by brood space limitation in highly predictable environments like fishless mountain or arctic lakes, as well as in highly unpredictable environments such as shallow fishless ponds and bogs. In the former, zooplankton abundance approaches the carrying capacity level and reproduction is limited to a short time window when the food concentration is sufficiently high to secure the survival of the *Daphnia* juveniles (e.g. lake Czarny Staw pod Rysami, Gliwicz *et al.*, 2001;

Ślusarczyk, 2009). The simultaneous release of neonates results in a rapid increase in the zooplankton density, and is followed by a decrease in the available food, thus the production of another clutch of eggs becomes maladaptive. The brood space limitation of reproductive investment could be of importance for *Daphnia* compelled to produce as many neonates as is allowed by their stored resources within a short time window when released neonates are able to survive and mature. In this scenario, favourable conditions are short-lasting, so it can be beneficial to produce eggs quickly, even if reproduction is constrained by the available brood space.

The major conclusion drawn from this study is that limitation of reproductive investment by brood chamber space may be more common in zooplankton than previously expected. Also, the size constraint hypothesis could be a fully fledged alternative or complementary (to the “singular arc” resulting from the increase of mortality with size) explanation for the intermediate resource allocation in *Daphnia*. Interestingly, brood space limitation of egg production in *Daphnia* may also be responsible for extending the duration of the juvenile stage within small amplitude cycles during interactions in a *Daphnia*-algae system (McCauley *et al.*, 2008). Finally, after considering the changes in brood size and in the egg or embryo volume at different food levels, the “space constraint” hypothesis should be more carefully tested as a possible cause of simultaneous allocation to growth and reproduction in other invertebrates, as well as in fish.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data can be found online at <http://plankt.oxfordjournals.org>.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank M. Rautio and S. Cerbin for making insightful comments that helped to improve this manuscript.

## FUNDING

This research was supported by a grant from the SCSR, Poland, (N N304 067336) to P. Maszczyk, as well as a grant 2011/03/B/NZ8/02093 from the Polish National Science Center to Z.M. Gliwicz. Maciej Bartosiewicz was supported by a PhD scholarship (2010–2012) from the *Groupe de recherche interuniversitaire en limnologie et en environnement aquatique, Université du Québec à Montréal*. J.J. was supported by the International PhD Projects Program of the Foundation for Polish Science operating within the Innovative Economy Operational Program 2007–2013 (PhD Program: Mathematical Methods in Natural

Sciences). J.K. was funded by the Jagiellonian University (DS/WBiNoZ/INoS 757/14). The final part of this study was carried out at the Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw, established within a project co-financed by the EU European Regional Development Fund under the Innovative Economy Operational Program, 2007–2013.

## REFERENCES

- Beeky, M. A. and Hornbach, D. J. (2004) The effect of size-limited brood capacity on reproductive output in a freshwater bivalve. *Am. Midl. Nat.*, **151**, 274–285.
- Beeky, M. A. and Karlson, R. H. (2003) The effect of food availability on zygote production and brood size in a freshwater bivalve. *Can. J. Zool.*, **81**, 1168–1173.
- Boersma, M. (1995) The allocation of resources to reproduction in *Daphnia galeata*: against the odds? *Ecology*, **76**, 1251–1261.
- Boersma, M. and Kreutzer, C. (2002) Life at the edge: is food quality really of minor importance at low quantities? *Ecology*, **83**, 2552–2561.
- Burns, C. W. (1995) Effects of crowding and different food levels on growth and reproductive investment of *Daphnia*. *Oecologia*, **101**, 234–244.
- Chaparro, O. R., Saldivia, C. L. and Paschke, K. A. (2001) Regulatory aspects of the brood capacity of *Crepidula fecunda* (Gastropoda: Calyptraeidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **266**, 97–108.
- Cohen, D. (1971) Maximizing final yield when growth is limited by time or by limiting resources. *J. Theor. Biol.*, **33**, 299–307.
- De Mott, W. R., McKinney, E. N. and Tessier, A. J. (2010) Ontogeny of digestion in *Daphnia*: implications for the effectiveness of algal defenses. *Ecology*, **91**, 540–548.
- Dudyka, J. L. and Lynch, M. (2005) Conserved ontogeny and allometric scaling of resource acquisition and allocation in the Daphniidae. *Evolution*, **59**, 565–576.
- Engen, S. and Sæther, B. E. (1994) Optimal allocation of resources to growth and reproduction. *Theor. Popul. Biol.*, **46**, 232–248.
- Fiksen, Ø. (1997) Allocation patterns and diel vertical migration: modeling the optimal *Daphnia*. *Ecology*, **78**, 1446–1456.
- Glazier, D. S. (1992) Effects of food, genotype, and maternal size and age on offspring investment in *Daphnia magna*. *Ecology*, **73**, 910–926.
- Glazier, D. S. (2000) Smaller amphipod mothers show stronger trade-offs between offspring size and number. *Ecol. Lett.*, **3**, 142–149.
- Gliwicz, M. Z. (1990) Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature*, **343**, 638–640.
- Gliwicz, M. Z., Ślusarczyk, A. and Ślusarczyk, M. (2001) Life history synchronization in a long-lifespan single-cohort *Daphnia* population in a fishless alpine lake. *Oecologia*, **128**, 368–378.
- Gliwicz, Z. M. and Maszczyk, P. (2007) *Daphnia* growth is hindered by chemical information on predation risk at high but not at low food levels. *Oecologia*, **150**, 706–715.
- Gliwicz, Z. M., Maszczyk, P. and Uszko, W. (2012) Enhanced growth at low population density in *Daphnia*: the absence of crowding effects or relief from visual predation? *Freshw. Biol.*, **57**, 1166–1179.
- Goulden, C. E., Henry, L. L. and Berrigan, D. (1987) Egg size, post-embryonic yolk, and survival ability. *Oecologia*, **72**, 28–31.

- Goulden, C. E. and Place, A. R. (1993) Lipid accumulation and allocation in daphniid Cladocera. *Bull. Mar. Sci.*, **53**, 106–114.
- Guisande, C. and Gliwicz, Z. M. (1992) Egg size and clutch size in two *Daphnia* species grown at different food levels. *J. Plankton Res.*, **14**, 997–1007.
- Gurney, W. S. C. and Middleton, D. A. J. (1996) Optimal resource allocation in a randomly varying environment. *Funct. Ecol.*, **10**, 602–612.
- Heino, M. and Kaitala, V. (1996) Optimal resource allocation between growth and reproduction: why does indeterminate growth exist? *Funct. Ecol.*, **10**, 245–251.
- Ioslovich, I. and Gutman, P. O. (2005) On the botanic model of plant growth with intermediate vegetative-reproductive stage. *Theor. Popul. Biol.*, **68**, 147–156.
- Jachner, A. (1991) Food and habitat partitioning among juveniles of three fish species in the pelagial of a mesotrophic lake. *Hydrobiologia*, **226**, 81–89.
- Kozłowski, J. (1991) Optimal energy allocation models—an alternative to the concepts of reproductive effort and cost of reproduction. *Acta Oecol.*, **12**, 11–33.
- Kozłowski, J. (1992) Optimal allocation to growth and reproduction: implications for age and size at maturity. *Trends Ecol. Evol.*, **7**, 15–19.
- Kozłowski, J. (2006) Why life histories are diverse. *Pol. J. Ecol.*, **54**, 585–605.
- Kozłowski, J. and Teriokhin, A. T. (1999) Allocation of energy between growth and reproduction: the Pontryagin Maximum Principle solution for the case of age- and season-dependent mortality. *Evol. Ecol. Res.*, **1**, 423–441.
- Kozłowski, J. and Ziółko, M. (1988) Gradual transition from vegetative to reproductive growth is optimal when the maximum rate of reproductive growth is limited. *Theor. Popul. Biol.*, **34**, 118–129.
- Lampert, W. (1993) Phenotypic plasticity of the size at first reproduction in *Daphnia*: the importance of maternal size. *Ecology*, **74**, 1455–1466.
- Lynch, M. (1989) The life history consequences of resource depression in *Daphnia pulex*. *Ecology*, **70**, 246–256.
- Lynch, M., Weider, L. J. and Lampert, W. (1986) Measurement of the carbon balance in *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, **31**, 17–33.
- Maszczyk, P. and Bartosiewicz, M. (2012) Threat or treat: the role of fish exudates in the growth and life history of *Daphnia*. *Ecosphere*, **3**, 91. doi:10.1890/ES12-00146.1.
- McCauley, E., Nelson, W. A. and Nisbet, R. M. (2008) Small-amplitude cycles emerge from stage-structured interactions in *Daphnia*–algal systems. *Nature*, **455**, 1240–1243.
- Mikulski, A., Czernik, M. and Pijanowska, J. (2005) Induction time and reversibility of changes in *Daphnia* life history caused by the presence of fish. *J. Plankton Res.*, **27**, 757–762.
- Myers, R. A. and Doyle, R. W. (1983) Predicting natural mortality rates and reproduction-mortality trade-offs from fish life history data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **40**, 612–620.
- Perrin, N. (1988) Why are offspring born larger when it is colder? Phenotypic plasticity for offspring size in the cladoceran *Simocephalus vetulus* (Müller). *Funct. Ecol.*, **2**, 283–288.
- Perrin, N. (1989) Reproductive allocation and size constraints in the cladoceran *Simocephalus vetulus* (Müller). *Funct. Ecol.*, **3**, 279–283.
- Perrin, N. (1992) Optimal resource allocation and the marginal value of organs. *Am. Nat.*, **139**, 1344–1369.
- Perrin, N., Ruedi, M. and Saiah, H. (1987) Why is the cladoceran *Simocephalus vetulus* (Müller) not a 'bang-bang strategist'? A critique of the optimal-body-size model. *Funct. Ecol.*, **1**, 223–228.
- Perrin, N. and Sibly, R. M. (1993) Dynamic models of energy allocation and investment. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **24**, 379–410.
- Sebens, K. P. (1987) The ecology of indeterminate growth in animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **18**, 371–407.
- Senerpont Domis, L. N., Bartosiewicz, M., Davis, C. *et al.* (2013) The effect of small doses of toxic cyanobacterial food on the temperature response of *Daphnia galeata*: is bigger better? *Freshw. Biol.*, **58**, 560–572.
- Sibly, R., Calow, P. and Nichols, N. (1985) Are patterns of growth adaptive? *J. Theor. Biol.*, **112**, 553–574.
- Ślusarczyk, M. (2009) Extended lifespan traded for diapause in *Daphnia*. *Freshw. Biol.*, **54**, 2252–2262.
- Sterner, R. W., Hagenmeier, D. D., Smith, R. F. *et al.* (1992) Lipid-ovary indices in food limited *Daphnia*. *J. Plankton Res.*, **14**, 1449–1460.
- Stibor, H. (1992) Predator induced life-history shifts in a freshwater cladoceran. *Oecologia*, **92**, 162–165.
- Stibor, H. and Muller-Navarra, D. (2000) Constraints on the plasticity of *Daphnia magna* influenced by fish-kairomones. *Funct. Ecol.*, **14**, 455–459.
- Strathmann, R. R., Strathmann, M. F. and Empson, R. H. (1984) Does limited brood capacity link adult size, brooding and simultaneous hermaphroditism? A test with *Asterin phylactica*. *Am. Nat.*, **123**, 796–818.
- Taylor, B. E. and Gabriel, W. (1992) To grow or not to grow: optimal resource allocation for *Daphnia*. *Am. Nat.*, **139**, 248–266.
- Taylor, B. E. and Gabriel, W. (1993) Optimal adult growth of *Daphnia* in a seasonal environment. *Funct. Ecol.*, **7**, 513–521.
- Tessier, A. J. and Goulden, C. E. (1982) Estimating food limitation in cladoceran populations. *Limnol. Oceanogr.*, **27**, 707–717.
- Zaret, T. M. (1980) *Predation and Freshwater Communities*. Yale University Press, New Haven, CT, USA.

## **VI.7. Załącznik 7**

Gliwicz Z. M., Maszczyk P., Jabłoński J., Wrzosek D. 2013 – Patch exploitation by planktivorous fish and the concept of aggregation as an antipredation defense in zooplankton – *Limnology and Oceanography* 58: 1621–1639.

## Patch exploitation by planktivorous fish and the concept of aggregation as an antipredation defense in zooplankton

Z. Maciej Gliwicz,<sup>1,\*</sup> Piotr Maszczyk,<sup>1</sup> Jędrzej Jabłoński,<sup>2</sup> and Dariusz Wrzosek<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Hydrobiology, University of Warsaw, Warsaw, Poland

<sup>2</sup>Institute of Applied Mathematics and Mechanics, University of Warsaw, Warsaw, Poland

### Abstract

Contrary to the suggestion that swarming can be used as an antipredation defense in zooplankton, the individual risk of a planktonic prey (*Daphnia*) increased rather than decreased with prey density up to 20–30 individuals  $L^{-1}$ , suggesting that planktivorous fish (roach [*Rutilus rutilus* L.]) preferentially feed where prey is more abundant, and confirming that planktonic prey may use both high- and low-density antipredation refuges at densities greater than 30 and lower than 20 individuals  $L^{-1}$ , respectively. This was revealed in experiments conducted in a system of interconnected 1 m<sup>3</sup> tanks with patchy *Daphnia* distribution, where fish were allowed to feed from dusk to dawn. The decline in *Daphnia* density was most dramatic in the tank with the highest prey abundance (reduction of up to 90%) as a result of a sigmoidal functional response (in capture rate of individual fish) combined with the rapid relocation of fish to where *Daphnia* were most plentiful. Adult *Daphnia* were depleted more rapidly than juveniles, this being most apparent in tanks with a low prey density, where the fish cruising speed doubled, hence the energy gain from small-bodied prey was probably insufficient to cover the cost of post-capture accelerations. A compartmental size-structured population model, which accounts for a predator's numerical response in space and optimization of foraging strategy, predicts less-selective low-speed harvesting at higher prey abundance, and high-speed searching at lower prey abundance, where the predator moves more rapidly in search of aggregations, but the increased cost of post-capture accelerations leads to lower value juveniles being ignored.

The prey perspective and studies on antipredation defenses suggest that an animal should join an aggregation to reduce its individual risk of predation (Hamilton 1971). The predator's perspective and studies on optimal foraging and patch exploitation suggest that an animal should feed on a patch of prey to ensure net food intake above the anticipated average over the entire habitat (Charnov 1976). This contradiction is most apparent in the context of the interface between predator–harvesters and their small-bodied prey scattered in the vast space of air (swifts or bats feeding on airborne insects) or water (fish feeding on planktonic crustaceans). This is particularly the case with predators known for their sigmoidal type III functional response (Holling 1959), and is most apparent in planktivorous fish of marine and freshwater habitats that feed on tiny planktonic crustacean prey.

In his critical article on the need to put predators back into the picture, Steven L. Lima argued that “in the study of behavioral predator–prey interactions, predators have been treated as abstract sources of risk to which prey respond” (Lima 2002). This may be the reason why studies on predator–prey interactions have yielded many ideas and observations in two categories that are widely separated from each other: one being focused on prey defenses and the other on predator foraging. The first category includes ideas and observations centered around the notion that prey aggregation is an antipredation defense due to risk dilution (Hamilton 1971), reduced encounter rate (Pitcher 1986), predator confusion (Milinski and Heller 1978), and vigilance sharing (Krebs 1974) providing early warning of a

predator (Magurran et al. 1985), each contributing to a lower per-capita predation risk. The second category includes ideas and observations centered around the notion of optimal foraging and patch exploitation (Stephens and Krebs 1986), which has the important implication that predators move about in search of prey aggregations as they “should feed preferentially in patches with the highest density of prey” (Lima 2002). The rift between the two categories is still evident in most recent papers on antipredation defenses (Daly et al. 2012; Ioannou et al. 2012) and optimal foraging (Bartoń and Hovestadt 2013).

The rift seems particularly apparent in studies on aggregating in zooplankton and those on patch exploitation in fishes. On the one hand, there are many studies showing that fish predation is one of the four main “biological drivers of zooplankton patchiness,” and that predators are able to “create patchiness in prey spatial distribution directly, by removing individuals, and indirectly by eliciting avoidance or escape responses,” as shown experimentally by the aggregation of *Daphnia* in response to fish kairomones in daylight (Pijanowska 1994; Pijanowska and Kowalczewski 1997). On the other hand, there are convincing models suggesting that optimal foraging by fish should lead to annihilation of zooplankton aggregations, since fish should seek patches of prey to ensure net food intake above the anticipated average over the entire habitat (Charnov 1976) in accordance with models of optimal patch choice (McNamara and Houston 1985; Stephens and Krebs 1986; Gilliam and Fraser 1988). These intuitive statements are only vaguely supported by observations that large prey aggregations are more easily detected than smaller ones by a visual predator due to

\* Corresponding author: z.m.gliwicz@uw.edu.pl



their broader visual angle (Jackson et al. 2005), as has recently been shown experimentally for the fish–*Daphnia* interface (Ioannou and Krause 2008; Ioannou et al. 2009).

The trust in aggregation as an adaptive antipredation-defense behavior in zooplankton and the conviction that fish foraging occurs in accordance with marginal value theorem that makes aggregated *Daphnia* more vulnerable to fish predation, are rather difficult to reconcile. This difficulty seems to be more apparent in aquatic habitats (i.e., the water column), where the most common predator–prey interface is that between visually oriented planktivorous fish and their tiny zooplankton prey. In this scenario, the predator acts as a harvester rather than a hunter and prey defend themselves by invisibility and evasion (descending to lower strata) rather than by active resistance. There are two major reasons why the reconciliation of these notions is so difficult.

The first reason is the greatly different spatial scales of the predator and its prey. The predator, such as a sardine or a roach, forages kilometers each day in search of its tiny prey, whereas the diel movements of the prey are restricted to meters. The disproportion is greatest when the interactions are examined along the horizontal plane, as predation risk for a zooplankton prey remains similar from one site to another, with different sites inaccessible to zooplankton on daily basis, but readily explored by foraging fish within a single feeding session at dusk or dawn. In contrast to their zooplankton prey, planktivorous fish such as golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) or roach are known for their long-distance dusk excursions offshore from their daytime littoral refuges (Hall et al. 1979; Gliwicz et al. 2006), and their sinusoidal cruising in long-distance searches for large-bodied zooplankton (Janssen 1981; Čech and Kubečka 2002). The disproportion in scale is greatly reduced when the interactions are examined along their vertical dimension, with the risk from visual predators changing rapidly as illumination declines exponentially with depth: from the light-saturated warm and food-rich surface layers to the cool but safe darkness of the depths used as a daytime refuge (De Meester et al. 1999).

The second reason is in the time scale difference due to the contrasting longevity of the vertebrate predator and its invertebrate prey. This causes great disproportion between the reproductive numerical responses in time, which are quick in a prey population but slow in a predator population. Dramatic mortality in a *Daphnia* prey translates merely to higher satiation of a predator that can fill its intestine with thousands of zooplankton prey within an hour, as has been shown in both field observations (Gliwicz et al. 2006) and experimental laboratory studies (Gliwicz et al. 2010).

In combination, the differences in both the spatial and time scales enable fish predators to mount a rapid numerical “aggregational” response to a patchy zooplankton prey distribution. Such numerical responses in space can be observed in fish aggregating in more food-profligate sites, where each aggregation has resulted from individual decisions by fish to remain at a site with high prey abundance rather than deliberately joining a shoal or school for safety or cooperative hunting. Any prey

aggregation is likely to cause a rise in the number of predators attracted to the site by high prey abundance—the preliminary effect of a single predator being gradually replaced by an effect of many predators congregating at the site and remaining there until the prey aggregation is annihilated. Optimally foraging predators eventually move on in search of the next patch of prey, thus ensuring a food intake above the anticipated average over the entire habitat (Charnov 1976). This seems to explain why studies on predator–prey interactions offshore have yielded so many conflicting ideas, each falling into one of two distinctly different categories depending on whether the focus was on the efficiency of prey defenses or on the effectiveness of predator foraging. Either the prey is treated as an abstract source of profit at different sites, or the predator is treated as an abstract source of risk to which the prey respond, with the latter scenario promoting the notion that aggregation represents an effective behavioral refuge against fish predation.

The goal of this study was to close this gap by using an experimental system accommodating different spatial scales in order to explain why zooplankton aggregations are not commonplace in offshore lake waters in spite of the powerful forces promoting their formation. The first hypothesis we tested was that planktivorous fish preferentially forage in sites with a high density of zooplankton prey, and that this may lead to rapid annihilation of prey patches, making prey individual risk higher within an aggregation in spite of the combined antipredation defenses of the group. The second hypothesis tested was that fish foraging on patchily distributed prey are less size-selective in locations with a high prey density than in those with a low density, and that this stems from a switch from less-selective low-speed harvesting in the former scenario to high-speed hunting in the latter, where the increased cost of post-capture accelerations necessitates the selection of adults due to the negative net gain from the capture of juveniles.

These two hypotheses were tested in an experimental study with *Daphnia* and roach, and in virtual experiments based on our age-structured population model, with size-dependent prey mortality stemming from optimal foraging on patchy prey.

## Methods

*The approach*—An experimental system of eight (2007) or four (2008–2009) interconnected 1 m<sup>3</sup> tanks allowed free movement of planktivorous fish between locations with different densities of *Daphnia* prey in natural mixtures of juveniles and adults, the initial density in one tank being up to two orders of magnitude higher than elsewhere in the system. In an effort to reduce translocation of *Daphnia* grown in or transferred to experimental tanks in different numbers, the inter-tank connections were closed between the every-night feeding sessions and reopened after the fish were transferred into the system. Changes in density of *Daphnia* prey were then followed for 2–6 d (43 and 23 d in two preliminary experiments [expts]). To imitate a natural field situation, fish predation was constrained by both the

number of fish added to the system and how long they were allowed to feed on the *Daphnia* prey. Both parameters were adjusted to be similar to those observed in natural lake habitats where feeding by planktivorous fish is usually restricted to antipredation windows at dusk and dawn (Clark and Levy 1988), when the underwater light level allows them to locate their prey without being seen by piscivores. As the same fish were used in experiments performed in the same year, an effort was made to reduce their learned ability to rapidly locate the tank with a high prey density, by switching this between tanks 1 and 5 or 1 and 3 (in the eight- and four-tank systems, respectively) for each subsequent experiment, starting at expt 6 (expts 1 and 2–5 were conducted in one long series with core *Daphnia* populations persisting in the tanks from one experiment to the next).

An almost identical approach was used in model simulations performed in a virtual system with the same number of interconnected tanks, the same number of fish allowed to feed overnight, similar rates of *Daphnia* growth and reproduction, and the same initial *Daphnia* densities in the high- and low-density tanks.

**Experimental animals**—As a typical freshwater planktivorous predator, 1–2 yr old roach (*Rutilus rutilus* L.) of 50–75 mm in length were selected from nocturnal seine net catches from the littoral zone of Lake Ros (Great Mazurian Lakes, Poland) and grown in 500 liter aquaria.

The *Daphnia* prey (*Daphnia hyalina galeata* clone HG011) was isolated from the hypolimnion of Lake Swiecajty (Great Mazurian Lakes, Poland), which contains high densities of planktivorous fish, with roach being the dominant species. *Daphnia* were mass-cultured on a mixture of natural phytoplankton and *Scenedesmus obliquus* propagated in a chemostat.

**The experiment**—The experimental system was similar to that used in our previous studies (Gliwicz and Wrzosek 2008; Gliwicz et al. 2010), except that the tanks (1 m<sup>3</sup>) were made of light polyester–glass fiber laminate, had different dimensions (101 cm high and 122 cm in diameter), were interconnected to allow free movement of fish across the entire system (Fig. 1), and equipped with infrared video cameras to record fish movements so that their numbers in single tanks with high and low initial *Daphnia* densities could be evaluated.

Predation of the *Daphnia* was constrained by the number of fish, the time that the fish were allowed to feed, and by reduction of the light level to below 9  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (integrated photosynthetically active radiation) by shading the experimental system with greenhouse netting, thus imitating light conditions in the dusk and dawn antipredation windows occurring in natural lake habitats when planktivorous fish usually feed. To exclude the predation of *Daphnia* by invertebrate predators, the experimental setup was covered with mosquito netting to prevent egg deposition by phantom midge (*Chaoborus*) and other insects (Fig. 1A), these representing a potential source of extraneous predation against which aggregating might be an effective defense (Kvam and Kleiven 1995). For each feeding session, the fish were transferred to each tank in a 1 liter steel bowl

constituting the central part of the bottom of a cage made of nylon netting (5 mm mesh). The lower and upper sections of the netting cage were shaped to fit inside of the daytime refuge and the tank, respectively (Fig. 1B), and the cage windows opened to allow free movement of fish (Fig. 1C). Fish movements in one high- and one low-*Daphnia*-density tank were registered using two submerged infrared video cameras per tank, each directed at one of the two connecting windows at an angle of 45°. Analysis of the resulting recordings was used to estimate fish velocity and to compute the number of fish in each of the tanks every 5 min throughout the first 2 h of each feeding session, when differences in fish numbers were most apparent.

At the start of each feeding session, when fish were transferred from their smaller daytime refuges (Fig. 1A) to the tanks with *Daphnia* prey, the cage windows were opened to allow free fish movement (Fig. 1C). Following each feeding session, the cage windows were closed, and the fish (trapped in the bottom bowl of the cages) transferred back to one of eight “refuge” tanks. Random manual transfer was then used to equalize the number of fish to eight per cage ready for the next feeding session. Following the removal of fish, the water in each experimental tank was thoroughly mixed by five upward movements of a perforated Secchi disk and samples were taken using a quantitative plankton net (six vertical hauls removing *Daphnia* from 30 liters, i.e., 3% of the tank volume) and fixed with formalin–sugar solution. *Daphnia* juveniles, adults, and eggs in brood cavities were enumerated in each sample by counts made using a dissecting microscope.

The effect of fish feeding on the densities of *Daphnia* in the tanks was examined in a preliminary experiment (performed in 2006) in which different parameters were manipulated. The variations tested included adding different numbers of fish to the system, altering the time of the start and finish of the daily feeding sessions, and allowing the *Daphnia* populations to grow on either low or high levels of algae (mixture of natural phytoplankton and *S. obliquus*), by adjusting the food level each day through the addition of concentrated *Scenedesmus* to 0.4 and 0.9 mg C L<sup>-1</sup>, which resulted in mean *Daphnia* clutch sizes of 5.2 and 9.3 eggs per clutch, respectively. The results of this preliminary experiment indicated that starting the 2-h feeding session at sunset did not allow 64 roach to effectively control the density of *Daphnia* prey once their number had increased to > 5 individuals (ind.) L<sup>-1</sup> (Fig. 1D). The same pattern was applied in expt 2 in 2007 (Fig. 2), but was changed to feeding sessions starting 2 h before sunset and ending 2 h after sunrise in all subsequent experiments performed in 2007 and 2008. Our preliminary observations also showed that most fish rapidly located the tank with the high *Daphnia* density and remained there for most of the 2 h of dusk. The higher number of roach in the tank with the *Daphnia* aggregation was still apparent at the end of each feeding session (Fig. 1D), when the fish were counted in the course of their transfer to the daytime refuges (Fig. 1B).

The fish number was checked in one high- and one low-*Daphnia*-density tank every 5 min during the first 2 h of dusk at each feeding session, when the major part of the

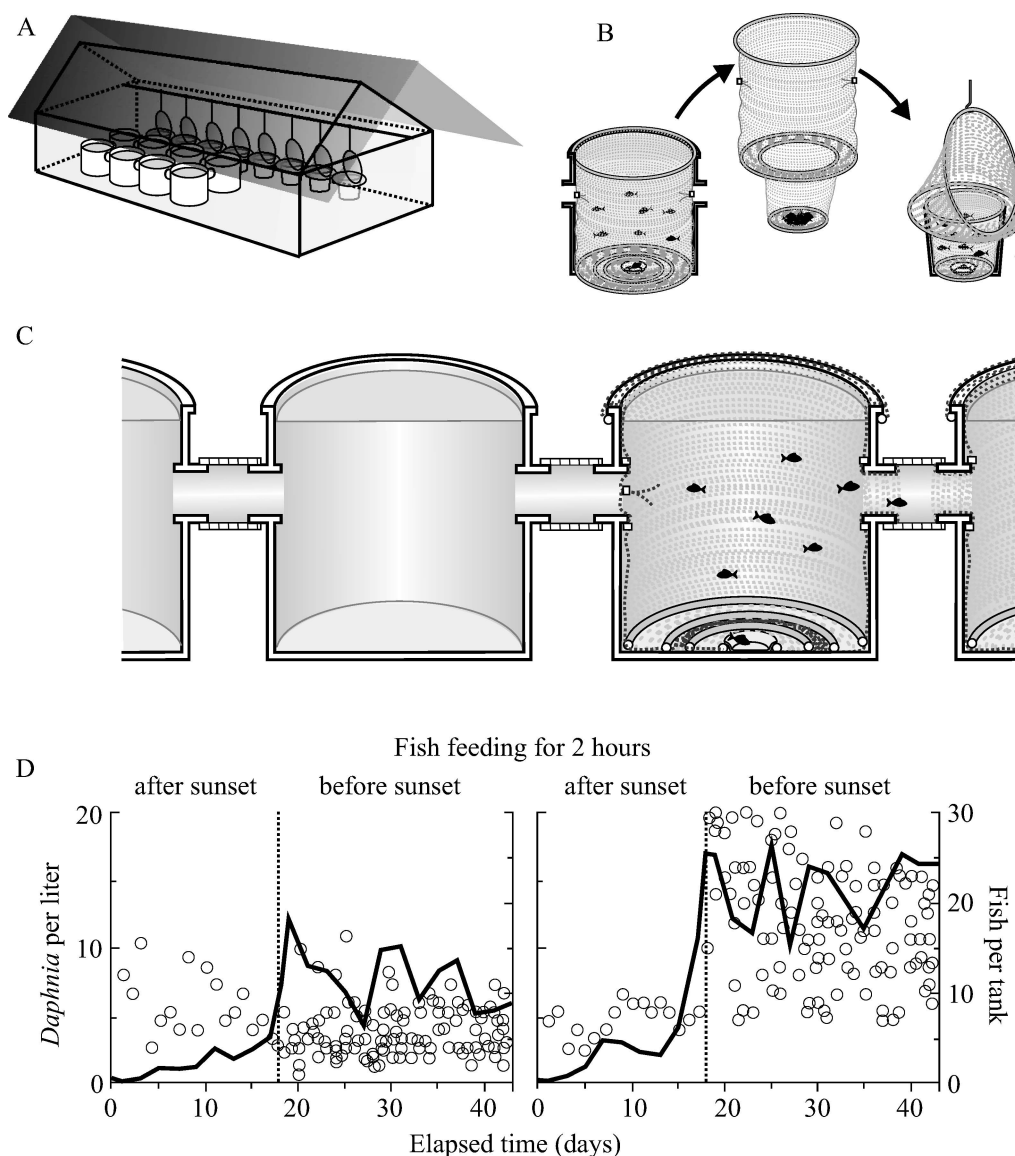


Fig. 1. The experimental system: (A) view of the entire system comprised of eight experimental tanks and eight daytime fish refuges; (B) procedure for transferring fish between a tank and a refuge; (C) cross section of tanks after fish have been transferred and can move freely between them; (D) *Daphnia* densities (lines) at the start of every evening feeding session in tanks with a low (left) or a high (right) density of *Daphnia* prey, maintained using different levels of algal food during the 42 d of the preliminary experiment in 2006 (expt 1), with the numbers of fish present in the low- and in the high-prey-density tank at the end of each feeding session (circles); the 2 h feeding session starting at sunset (until day 22) or 2 h before sunset (from day 23).

prey was eaten by the roach (the number of fish foraging later at dawn in the high- and low-*Daphnia*-density tanks was less variable, but their mobility was reduced and feeding less intense, hence differences in their effect were ignored). The fish number was determined from recordings of those entering and leaving the tank made using two video cameras each observing one of the two connecting windows at an angle of  $45^\circ$  with the objective 1 cm below the water's surface. These cameras were set at the same position after the cages with fish had been placed into the tanks, but before the connecting windows were opened. The four cameras were connected to a digital image analysis system so that the picture from each camera could be viewed in a separate quarter of a monitor screen.

The birth rate of *Daphnia* in high- and low-prey-density tanks,  $b$ , was determined according to the Edmondson–Paloheimo equation,  $b = \ln[1 + (E:N)]/D$ , where  $E$  is the total number of eggs and  $N$  is the total number of individuals, both per liter, before the start of a fish feeding session, and  $D$  is the development time of eggs in days, determined from the regression relating duration of egg development to the daily temperature in the experimental and control tanks (Bottrell et al. 1976). Instantaneous death rates,  $d$ , were computed as  $d = b - r$  ( $r$  being the instantaneous per-capita growth rate, calculated as  $r = [\ln N_{t+\Delta t} - \ln N_t]/\Delta t$ ). Recruitment was assessed as the number of newborn *Daphnia* released from all clutches of eggs per liter per day ( $E:D$ ), with elimination being the



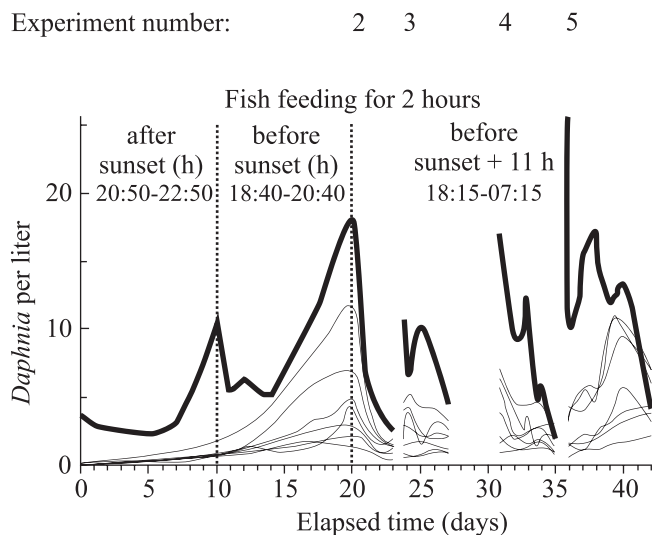


Fig. 2. *Daphnia* densities in eight interconnected tanks supplied daily with high (in tank 1, solid line) and low (in the seven remaining tanks, dotted lines) quantities of algal food (natural phytoplankton and *Scenedesmus obliquus*), from the time of inoculation (day 0) to the first reduction, when the fish feeding time was changed from 2 h after to 2 h before sunset (day 10), and continuing until prey numbers were reduced by fish allowed to feed overnight from 2 h before sunset to 2 h following sunrise (days 20–23, expt 2, 2007). Each of the subsequent expts 3, 4, and 5 was started after the addition of large or small *Daphnia* numbers to, respectively, tank 1 and tanks 2–8, a few hours before the onset of the first feeding session, without waiting for population growth (as in expts 1 and 2). This procedure allowed the duration of the experiments to be shortened and precluded gradual dilution of the initial differences in *Daphnia* prey density before the first feeding session as a result of faster *Daphnia* growth in the low-density tanks than in high-density tank 1, and water exchange between the tanks—both being apparent in expt 2 on day 20 when *Daphnia* was nearly as abundant in tank 2 as in the neighboring high-density tank 1.

difference between the expected and real density at time  $t$  ( $N_t \text{ expected} - N_t$ ), and  $N_t \text{ expected}$  computed from density on the preceding sampling day ( $N_{t-\Delta t}$ ) as  $N_{t-\Delta t} + (E:D)\Delta t$ ,  $\Delta t$  being always 1 d.

The capture rate of individual fish,  $C$ , was calculated as  $C = El_{Dph} : n_{fish}$ , where  $El_{Dph}$  is the number of *Daphnia* prey ( $Dph$ ) eliminated from one tank during each daily feeding session, and  $n_{fish}$  is the mean number of fish in a given tank during the first 2 h of a feeding session, when the major part of *Daphnia* were eaten by roach.

The velocity of fish movements in high- and low-prey-density tanks was estimated from archived video recordings by examining two frozen images and measuring the distance traveled by fish moving within the bottom 20 cm layer in any direction on a horizontal plane (against a centimeter scale marked on the tank's bottom, ignoring fish that were ascending or descending), then dividing this by the time elapsed between the images. In the case of nonlinear movements, the track of an individual fish was copied from the monitor screen and its length estimated after straightening the line.

A total of 25 experiments were carried out between July and September in the years 2006 to 2009 (Table 1): two

experiments with *Daphnia* grown from small inocula at high ( $0.5 \text{ mg C L}^{-1}$ ) and low ( $0.1 \text{ mg C L}^{-1}$ ) food levels produced by daily supplementation with *Scenedesmus* (such as expt 1 in Fig. 1), and 23 experiments with mass *Daphnia* introductions on the day of the first feeding session.

*The model and simulations*—The new model used for simulations to compute the capture rate of each fish in different locations within the experimental system in each unit of time during every dusk-to-dawn feeding session is focused on the prey rather than the predator, but it does incorporate the notion of optimal foraging in each of its different aspects (optimal diet, optimal patch, optimal time allocation to different patches, optimal speed of movement), which are rather difficult to blend (Pyke et al. 1977). The central question addressed in this paper, however, is not the importance of feeding mode to the predator, but the effect of selective feeding on the abundance and structure of the prey population that results both from the predator's mode of feeding and its aggregational numerical response to patchy prey distribution. The separate categories of *Daphnia* prey are different with respect to their nutritional value and conspicuousness, but not in their evasion ability, which is also important for prey selection by a foraging fish (Manatunge and Asaeda 1999).

The model follows and extends the ideas introduced in a previous study (Gliwicz and Wrzosek 2008), where the Holling type III multi-prey functional response was modified by adding a critical number of prey items in the visual field volume needed to instigate a predator's attack, a phenomenon that was not considered in earlier models of optimal foraging in planktivorous fishes. In the present study, this model was also applied to the case in which the predator's numerical response in space is taken into account. Simulations define the behavior of  $N$  fish in an  $M$ -tank system and predict the density of the prey, number of fish in each tank, and energy gain of each fish per unit of time. When adopting one of the two alternate foraging strategies, each fish obeys the same randomized algorithm by taking into account the state of the prey population in the tank where it is currently foraging and the anticipated state of prey in the remaining  $M - 1$  tanks of the experimental system that it visits during each overnight feeding session. Each decision results in the choice of an optimal behavioral mode, which includes the time of residence in the tank and the temperature-dependent velocity of fish movement associated with the cost of capture, which may be higher than the value of an encountered prey. A similar idea of switching between feeding modes was recently explored by Bartoń and Hovestadt (2013).

*Dynamics of the prey population*—We distinguish two categories of prey (juveniles and adults), and assume that each is uniformly distributed within each tank of the system composed of  $M$  tanks, regardless of whether its initial density is high (as in 1 of  $M$  tanks) or low (as in the  $M - 1$  remaining tanks). Our model specifies how the density of each prey category changes due to its growth and size-dependent predation. The foraging behavioral mode

Table 1. Details of 25 experiments performed in the period 2006–2009 (including preliminary expts 1 and 2), such as the starting date, duration, water temperature, number of tanks in the system, mean fish velocity ( $V$ ) when harvesting or searching (in high and low *Daphnia* prey densities, respectively), egg developmental time, age at first reproduction, initial number of prey in low- and high-density tanks, the percentage of prey eliminated during the first night of the experiment in low- and high-density tanks, and the ratio of the first-night declines.

Experiment	Starting date	Duration (d)	Water temperature range or mean (°C)	No. of tanks	Fish velocity when harvesting searching		Egg developmental time (d)	Age at first reproduction (d)	Initial density (ind. L <sup>-1</sup> )		First-night density decline (%)		Ratio of the two declines (high : low)
					$\alpha_H$ (cm s <sup>-1</sup> )	$\alpha_S$ (cm s <sup>-1</sup> )			High	Low	High	Low	
1	20 Aug 2006	43	15.8–19.9	8									
2	08 Jul 2007	23	16.5–20.4	8									
3	01 Aug 2007	4	16.1	8	12.1	20.4	3.9	8.5	10.6	3.8	37.7	10.5	3.6
4	08 Aug 2007	4	21.7	8	13.4	39.9	2.3	5.0	16.9	5.1	45.1	18.3	2.5
5	13 Aug 2007	5	21.6	8	13.4	39.4	2.3	5.0	25.7	3.0	60.1	4.8	12.5
6	07 Sep 2007	2	13.6	8	11.6	15.1	5.2	11.2	14.7	0.2	83.3	36.4	2.3
7	14 Sep 2007	4	13.8	8	11.6	15.5	5.1	10.9	12.9	0.2	64.0	41.0	1.6
8	30 Sep 2007	7	13.9	8	11.6	15.6	5.0	10.8	48.3	0.6	40.8	13.0	3.1
9	05 Jul 2008	2	18.8	4	12.7	28.2	3.0	6.5	18.3	0.8	76.7	74.3	1.0
10	05 Jul 2008	2	19.2	4	12.8	29.6	2.9	6.3	18.4	1.3	69.0	70.6	<1.0
11	12 Jul 2008	3	21.4	4	13.3	38.5	2.4	5.1	28.5	3.8	81.8	79.6	1.0
12	24 Jul 2008	4	21.2	4	13.3	37.6	2.4	5.2	23.2	1.7	72.1	44.4	1.6
13	24 Jul 2008	4	21.2	4	13.3	37.6	2.4	5.2	24.1	1.6	74.8	25.7	2.9
14	16 Aug 2008	4	19.3	4	12.8	29.9	2.9	6.2	28.8	2.2	76.8	56.0	1.4
15	16 Aug 2008	4	19.3	4	12.8	29.9	2.9	6.2	23.7	4.9	77.0	78.7	<1.0
16	23 Aug 2008	3	16.9	4	12.3	22.4	3.6	7.8	24.6	1.6	92.8	60.5	1.5
17	23 Aug 2008	3	16.8	4	12.3	22.2	3.7	7.9	19.9	3.1	75.3	41.6	1.8
18	13 Jul 2009	1	17.7	4	12.5	24.7	3.3	7.2	34.6	4.2	48.8	3.1	15.7
19	12 Jul 2009	1	17.8	4	12.5	25.0	3.3	7.2	33.6	3.7	44.0	21.7	2.0
20	23 Jul 2009	1	20.4	4	13.1	34.1	2.6	5.6	47.6	5.1	68.3	36.8	1.9
21	23 Jul 2009	1	20.4	4	13.1	34.1	2.6	5.6	36.2	4.0	88.7	51.3	1.7
22	31 Jul 2009	1	20.8	4	13.2	35.8	2.5	5.4	43.5	4.9	38.7	14.6	2.7
23	31 Jul 2009	1	20.9	4	13.2	36.3	2.5	5.4	41.7	5.0	46.6	5.8	8.0
24	08 Aug 2009	1	19.5	4	12.9	30.6	2.8	6.1	45.6	5.4	90.5	54.0	1.7
25	08 Aug 2009	1	19.5	4	12.9	30.6	2.8	6.1	49.0	6.0	62.8	39.5	1.6

consists of the duration of the residence time in the tank and the foraging strategy, which implies certain functional responses. For simplicity we distinguish two foraging strategies: low-velocity harvesting ( $H$ ) where prey of each category is captured, and high-speed searching ( $S$ ) where juveniles are ignored because each capture requires greater investment for the post-capture acceleration.

In all the time periods when neither the feeding strategy nor the location of fish is altered, the density of juveniles  $N_1$  and the density of adults  $N_2$  is described by

$$\begin{cases} \frac{dN_1}{dt} = fN_2\left(1 - \frac{N_1+N_2}{K}\right) - mN_1 \\ \quad - (C_{1,S}(N_1, N_2)n_S + C_{1,H}(N_1, N_2)n_H) \\ \frac{dN_2}{dt} = mN_1 - (C_{2,S}(N_1, N_2)n_S + C_{2,H}(N_1, N_2)n_H) \end{cases} \quad (1)$$

where  $n_S$  and  $n_H$  represent the number of fish using strategies  $S$  and  $H$ , respectively,  $f$  is the prey fecundity,  $m$  is the recruitment rate to adults,  $K$  is the carrying capacity, and  $C_{i,st}$  is the size- and strategy-dependent functional response attributed to either strategy  $st = S$  (searching) or  $st = H$  (harvesting).

**Functional response**—The functional response is based on ideas introduced in Gliwicz and Wrzosek (2008), with an additional strategy-dependent parameter that changes according to the feeding strategy. In the  $H$  strategy, a fish feeds on all prey categories with an intensity proportional to its reaction field volume, while in the  $S$  strategy, the fish totally ignores juvenile prey. The consumption rate corresponding to the  $i$ th prey category is

$$C_{i,st}(N_1, N_2) = \frac{\rho\pi\alpha_{st}\delta_i^2 s_i N_i}{1 + \pi\alpha_{st}\rho T_h(s_1\delta_1^2 N_1 + s_2\delta_2^2 N_2)} \quad (2)$$

where  $\delta_i$  is the reaction distance, and parameter  $\rho = \rho(x)$  is defined as  $x^z : (y^z + x^z)$ , where  $x$  is the number of prey in the reaction field volume, a half-saturation constant  $\gamma > 0$  is a critical number reflecting at least residual presence of prey within the reaction field volume necessary to instigate the predator's attack,  $z$  is a shape parameter (the higher  $z$ , the more abrupt the switching),  $\alpha_{st}$  is the strategy-related fish velocity,  $\rho \times s_i$  is the fraction of encountered prey that are captured from the  $i$ th category (details in Gliwicz and Wrzosek 2008), the couple  $(s_1, s_2)$  is equal to  $(0, 1)$  in strategy  $S$ , and  $(1, 1)$  in strategy  $H$ , and  $T_h$  is the handling time.

**Behavioral modes**—In different situations it may be profitable for a fish to either remain in the same tank for as long as possible or for as short as possible. The first scenario is limited by the “curiosity” of the fish and its efforts to avoid interference competition (P. Maszczyk, M. Bartosiewicz, J. E. Jurkowski unpubl.), so the time cannot exceed  $T_{\max}$ . The second is limited by the minimal time of residence related to the velocity of the fish, which is different in strategies  $H$  and  $S$ . The actual choice is therefore between different residence times (maximum  $T_{\max}$ , minimum when searching  $T_{\min,S}$ , and minimum when harvesting  $T_{\min,H}$ ) as well as between lower (when harvesting) and higher (when searching) speed, with the

latter increasing the prey encounter rate but reducing the net gain from a single capture due to the more costly post-capture acceleration needed to regain the higher speed.

**Energy gain evaluation**—The total net energy gain that can be achieved by each of the available strategies is the sum of the net instantaneous energy gain and the anticipated energy gain. The instantaneous energy gain attributed to a given fish employing the strategy  $st$  is

$$w_1 C_{1,st} + w_2 C_{2,st} - e_{st}(C_{1,st} + C_{2,st}) + \xi \quad (3)$$

where  $w_i$  is the body mass of a single individual of class  $i$  and  $e_{st}$  is the energy lost for each post-capture acceleration to either the lower or higher velocity in the harvesting and the searching mode, respectively. The instantaneous energy gain is assessed with normally distributed error  $\xi \sim N(0, \sigma)$ . Apart from the instantaneous energy gain, a fish accounts for the anticipated energy gain it could achieve in the future by choosing a shorter residence in a given tank (instead of  $T_{\max}$ ). By this definition, when choosing  $T_{\max}$ , the anticipated energy gain is equal to 0. On average, a moving fish visits the high-prey-density tank (one of the  $M$  tanks) with probability equal to  $1 : M$ . As a consequence, choosing  $T_{\min,st}$  will allow the fish to feed in the high-density tank for a period that is  $[(T_{\max} - T_{\min,st})T_{\max}] : [T_{\max} + (M - 1)T_{\min,st}]$  longer compared with that which could be achieved by choosing  $T_{\max}$ . Anticipated energy gain is equivalent to the energy that could be gained during the same time period spent in the high-density tank.

**Optimal foraging**—A fish in a given tank makes an optimal choice between harvesting ( $st = H$ ) and searching ( $st = S$ ), for either a short time ( $T_{\min}$ ) or a long time ( $T_{\max}$ ) in each case. In the former scenario an additional benefit comes from the anticipated energy gain. For simplicity, we assume that the choice of residence time is fixed just after arrival in a given tank and is based on the total net energy gain evaluation. After the time of residence passes, the fish then moves to a randomly chosen tank.

**Other critical parameters**—The values of model parameters (best fitting, assumed a priori, and fixed) are listed in Table 2. The values of other parameters, such as the initial density of *Daphnia* prey in the high- and low-density tanks, fish velocities when harvesting ( $\alpha_H$ ) or searching ( $\alpha_S$ ), and the temperature-dependent rates of prey reproduction and recruitment to the adult category, were adopted from experimental data individually for each simulation from the values listed in Table 1. The rate of prey reproduction was computed as  $f = e/T$  (where  $T$  is the duration of egg development,  $e$  is the number of eggs per clutch), and the recruitment rate to adults as  $m = 1/\lambda$ , where  $\lambda$  is the average age at first reproduction (from data in Maszczyk and Bartosiewicz 2012). The following parameters were found to be the most sensitive: light-dependent reaction distance, residence time (affecting the degree of aggregation in fish), and the parameter  $\gamma$ , indicating the presence of prey within the reaction field volume (necessary to instigate the predator's attack).

Table 2. List of the model parameters: best fitting, assumed a priori, and fixed, based on previous studies. Other parameters (fish velocity, *Daphnia* egg developmental times, age at first reproduction, initial densities) required for individual simulations were taken from experimental data listed in Table 1.

Symbol (units)	Value	Description
<b>Best fitting</b>		
$z$	3	Parameter of Eq. 2
$\gamma$	0.05	Parameter of $\rho$ from Eq. 2
$T_h$ (s)	4	Handling time
$T_{\min H}$ (s)	12	Minimal time of residence in harvesting strategy
$T_{\min S}$ (s)	10	Minimal time of residence in searching strategy
$T_{\max}$ (s)	60	Maximal time of residence
<b>Assumed</b>		
$e_h$ ( $\mu\text{g C}$ )	5.0	Capture cost when in harvesting mode
$e_s$ ( $\mu\text{g C}$ )	6.7	Capture cost when in searching mode
<b>Fixed</b>		
$w_1$ ( $\mu\text{g C}$ )	6	Body carbon of a juvenile prey (Gliwicz 1990)
$w_2$ ( $\mu\text{g C}$ )	9	Body carbon of an adult prey (Gliwicz 1990)
$K$ (ind. $\times\text{dm}^{-3}$ )	72	Prey carrying capacity (Gliwicz and Wrzosek 2008)
$\delta_{1\max}$ (cm)	4	Reaction distance for a juvenile prey 2 h before sunset*
$\delta_{2\max}$ (cm)	8	Reaction distance for an adult prey 2 h before sunset*

\* Based on Gliwicz et al. (2010). The light-dependent reaction distance was assumed to have its maximal value at 18:00 h and then decrease to zero by 24:00 h according to a piecewise linear function. The shape of this function was chosen in a process of calibration and can be described by its values at 19:00 h ( $0.3 \times \delta_{1\max}$ ), 22:30 h ( $0.01 \times \delta_{1\max}$ ), and 24:00 h (0.0). The function features full symmetry around midnight.

## Results

***Daphnia* density and rate of its elimination**—The results of preliminary expt 1 conducted in 2006 indicated that fish feeding sessions restricted to 2 h after sunset were insufficient to allow 64 fish to prevent exponential growth of *Daphnia* populations at either high or low reproduction rates resulting from different food levels. This was the case only when the fish were allowed to feed for 2 h before the sunset (Fig. 1D, lines), when the number of fish at the end of each feeding session was found to be much higher in the tank 1, with the high *Daphnia* density, than in any of the other tanks (Fig. 1D, circles).

The same outcome was also observed in the initial 14 d of expt 2 in 2007, when *Daphnia* populations were again grown on either high (tank 1) or low (tanks 2–8) levels of algal food, with the lowest in tank 5, which was most distant from tank 1 (Fig. 2). In this experiment, the 64 fish were able to control the *Daphnia* density from day 10, when fish feeding sessions were shifted from 2 h after sunset to 2 h before sunset. The equilibrium lasted for 4 d, but was terminated by a rapid increase in *Daphnia* density accompanying a gradual rise in water temperature (16.5–20.4°C; Fig. 2). To prevent any further increase, from day 20, the feeding sessions were extended overnight, i.e., beginning 2 h before sunset and ending 2 h after sunrise. This resulted in a dramatic decline in *Daphnia* density that was most spectacular in tank 1 but was also apparent in tank 5 with the lowest prey density (days 20–23).

After a 1 d break in fish feeding sessions, prey densities were restored by the transfer of *Daphnia* from mass cultures, thus allowing expt 3 to start on day 24, with the same procedure being repeated on days 31 (expt 4) and 36 (expt 5). These prey supplementations produced similar effects on the *Daphnia*, with the most dramatic declines observed in the high-density tanks, leading to equal prey

densities across the entire system within a couple of days (Fig. 2). The effect was most spectacular in expts 4 and 5 (days 31–35 and 36–42, respectively), when more frequent *Daphnia* sampling (just before and just after each overnight feeding session) provided evidence of increases in prey density when the fish were away in their daytime refuges. The remaining 20 experiments were all carried out following the mass transfer of *Daphnia* on the day of the first feeding session (Table 1).

The rate of elimination of *Daphnia* prey was always greatest during the first overnight feeding session. Prey density declines were usually much greater in the high- than the low-density tanks, particularly in the experiments performed in 2007 with eight tanks in the system (2–12-fold; Table 1). Although the subsequent overnight declines were slower, they led to nearly even prey densities in all tanks within three overnight feeding sessions in many of the experiments (Fig. 3A). Simulations conducted with our model, starting with densities equal to those in experiments, gave very similar results when shown as density change (Fig. 3B, left) with the difference apparent only when shown as a change in the percentage of the initial prey density (Fig. 3B, right panel).

The simulations also allowed us to see distinct declines at dusk and dawn in the same three experiments (Fig. 4A), and to predict the outcome of various scenarios: when the tanks are disconnected leaving eight fish in each tank, thus precluding a numerical response in space within the same 64 fish in the system (Fig. 4B) when the number of fish in the system is reduced to 0.1875 fish per tank (1.5 fish in the system of eight tanks) with tanks interconnected (Fig. 4C) or disconnected with 0.1875 fish in each (Fig. 4D).

***Change in fish distribution***—Although the aggregation of fish at high *Daphnia* prey densities was evident in the



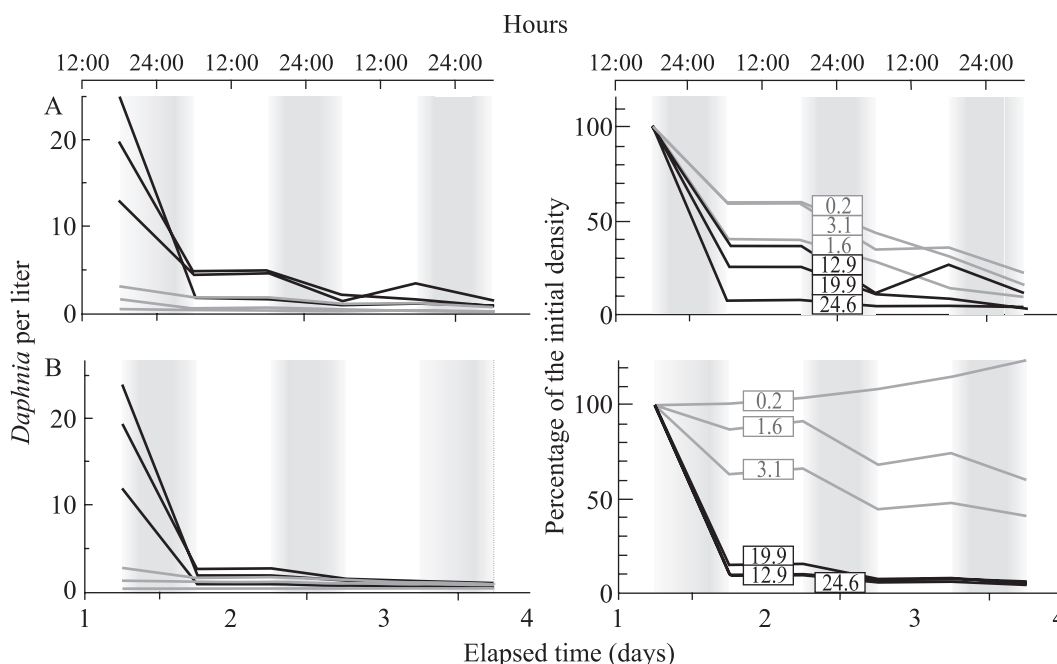


Fig. 3. Three typical examples of *Daphnia* prey density changes in the tank with high (black line) and the tanks with low (gray line) initial prey densities, shown as numbers of *Daphnia* per liter (left) and as a percentage of the initial density (right) to demonstrate the difference between the high- and the low-density tanks. Boxed numbers indicate initial prey densities in high- and low-density tanks (respectively, black and gray), and nighttime is shown by vertical gray bars: (A) data from experiments 7, 16, and 17; (B) data from model simulations starting with the same initial *Daphnia* prey densities and using the same temperatures and fish velocities as in expts 7, 16, and 17; and calibrated to fit best both the prey density declines and the changes in fish distribution in the experimental system.

preliminary experiment conducted in 2006 (Fig. 1D), this was found to be much more rapid when the number of fish was assessed by video recording in 2007 and 2008. The grouping of experimental roach in tank 1 with the highest prey density was immediate at the first feeding session (Fig. 5A), compared with the sessions one night (Fig. 5B) and two nights later (Fig. 5C), when *Daphnia* densities no longer differed between the tanks (Fig. 4A), and the number of fish aggregating in tank 1 declined gradually over the subsequent sessions due to the *Daphnia* density becoming less and less attractive. Similar grouping at the first feeding session was also evident in expts 7 and 16 (Fig. 5D, left), and in simulations starting from the same initial *Daphnia* prey densities (Fig. 5D, right).

**Birth and death rates in *Daphnia***—The slight rise in birth rate of experimental *Daphnia* that accompanied increasing population density (Fig. 6A) was completely offset by a much greater increase in death rate (Fig. 6B), which resulted in a drastic decline in the growth rate of a *Daphnia* population as its density increased (Fig. 6C). This was due to high death rates that were not compensated by birth rate, particularly at high density levels where predation was stronger (see Fig. 3). The observed changes in these parameters were all in line with the expected increase in individual risk with an increasing prey density.

**Individual risk in *Daphnia* prey as a result of functional and numerical responses in fish**—It was reasoned that the

individual risk of *Daphnia* at different density levels could be assessed from the data on the capture rate for all fish in a given tank (combined functional and numerical aggregational responses at different prey densities in Fig. 7B). Such integrated capture rates (specific for each prey density level) were obtained from the experimental data (circles in Fig. 7B) and from simulations using the model (small circles composing a line in Fig. 7B). They were also used to calculate the individual fish capture rates (Fig. 7A).

When the ordinate value of each data point in Fig. 7A or 7B, derived experimentally or through simulations, was divided by the respective density of *Daphnia* prey, a value of individual risk for a *Daphnia* at a given density level was obtained on the abscissa that either results from the presence of a single fish and its functional response to prey abundance (Fig. 7C), or results from the joint effect of the functional and numerical responses (Fig. 7D), each at different prey density levels.

The risk resulting from the functional response of a single fish (Fig. 7C) was found to be highest at the intermediate abundance of 3 *Daphnia* L<sup>-1</sup>, and declined similarly as the prey density became either lower or higher. The risk as a result of the functional response combined with the numerical response (Fig. 7D) was highest at a prey abundance an order of magnitude higher (around 30 *Daphnia* L<sup>-1</sup>), and did not decline much at densities approaching the carrying capacity of most aquatic habitats. Moreover, this decline was slight—compared with the functional response alone, the risk remained huge even at very high prey abundance.

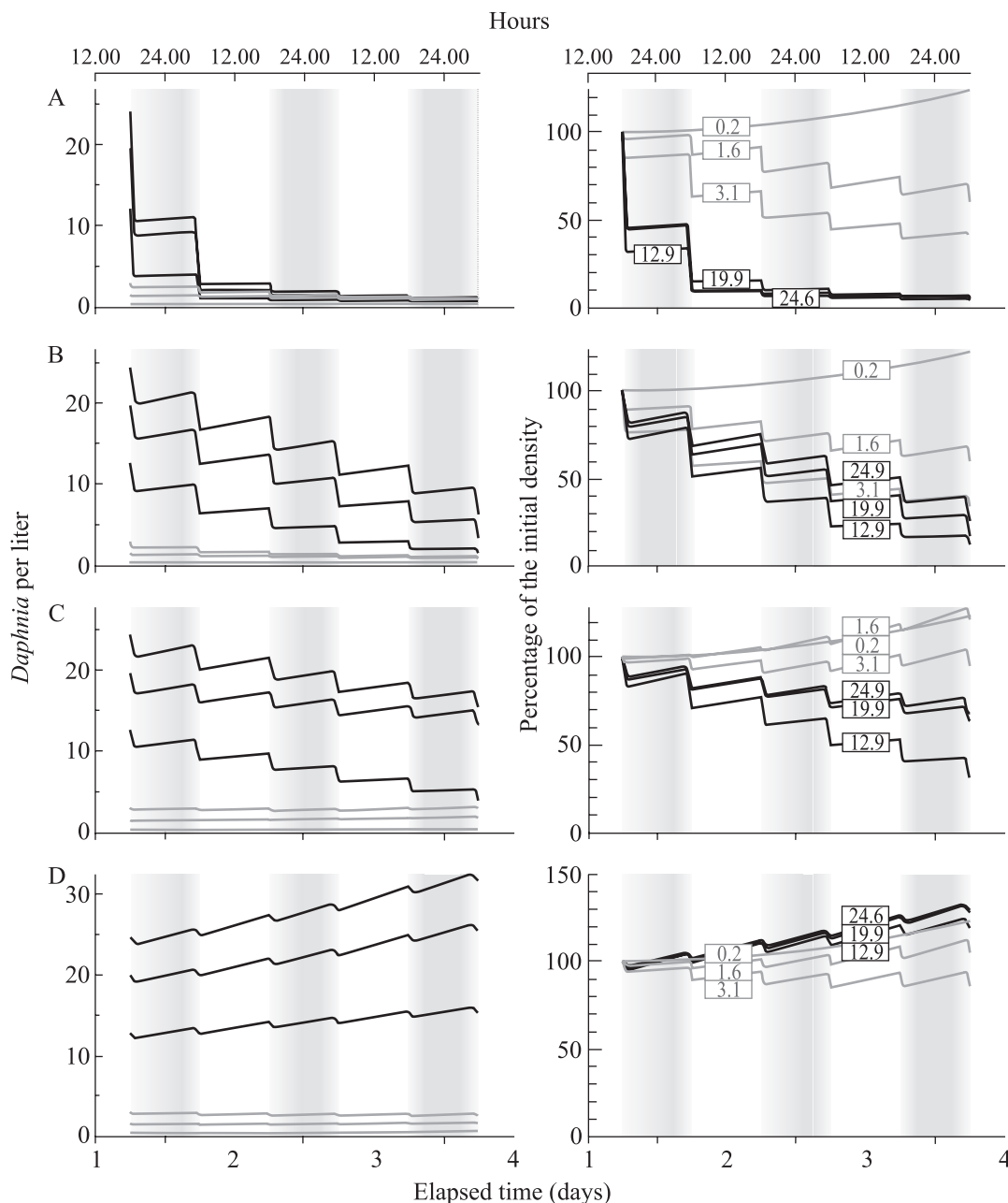


Fig. 4. The same three examples of *Daphnia* prey density changes in the tank with high (black line) and the tanks with low (gray line) initial prey densities (as in Fig. 3B), shown as numbers of *Daphnia* per liter (left) and as a percentage of the initial density (right, each experiment depicted by its initial density levels to demonstrate the difference between the high- and the low-density tanks), described in model simulations using the same initial *Daphnia* densities as expts 7, 16, and 17; the prey density declines and the changes in fish distribution in the experimental system are shown as continuous density change with two distinct twilight declines at dusk and dawn resulting from the following: (A) the integrated functional and numerical “aggregational” responses of all fish in the system when the tanks remain interconnected—eight fish per tank; (B) the functional responses of all fish confined to their initial tanks—eight fish per tank, tanks disconnected; (C) the integrated functional and numerical “aggregational” responses of all fish in the system when the tanks remain interconnected—one fish per tank; (D) the functional responses of all fish—one fish per tank, tanks disconnected.

The model simulations showed that the risk in the high-prey-density tank became higher as the difference in prey density between the high- and the low-density tanks increased (Table 3). The experimental data, shown by filled circles in Fig. 7D, as well as the outcome of model simulations, shown as an aggregation of small circles, represent the lowest prey densities in low-density tanks

(below 1 *Daphnia* L<sup>-1</sup>). The experimental data for higher prey densities in low-density tanks (the empty circles in Fig. 7D) indicated lower risk. The simulations also revealed that variability in risk increased dramatically with the density increase in the low-density tanks (Table 3), which was an evident effect of weaker motivation of fish to remain in the higher-density tank once the difference

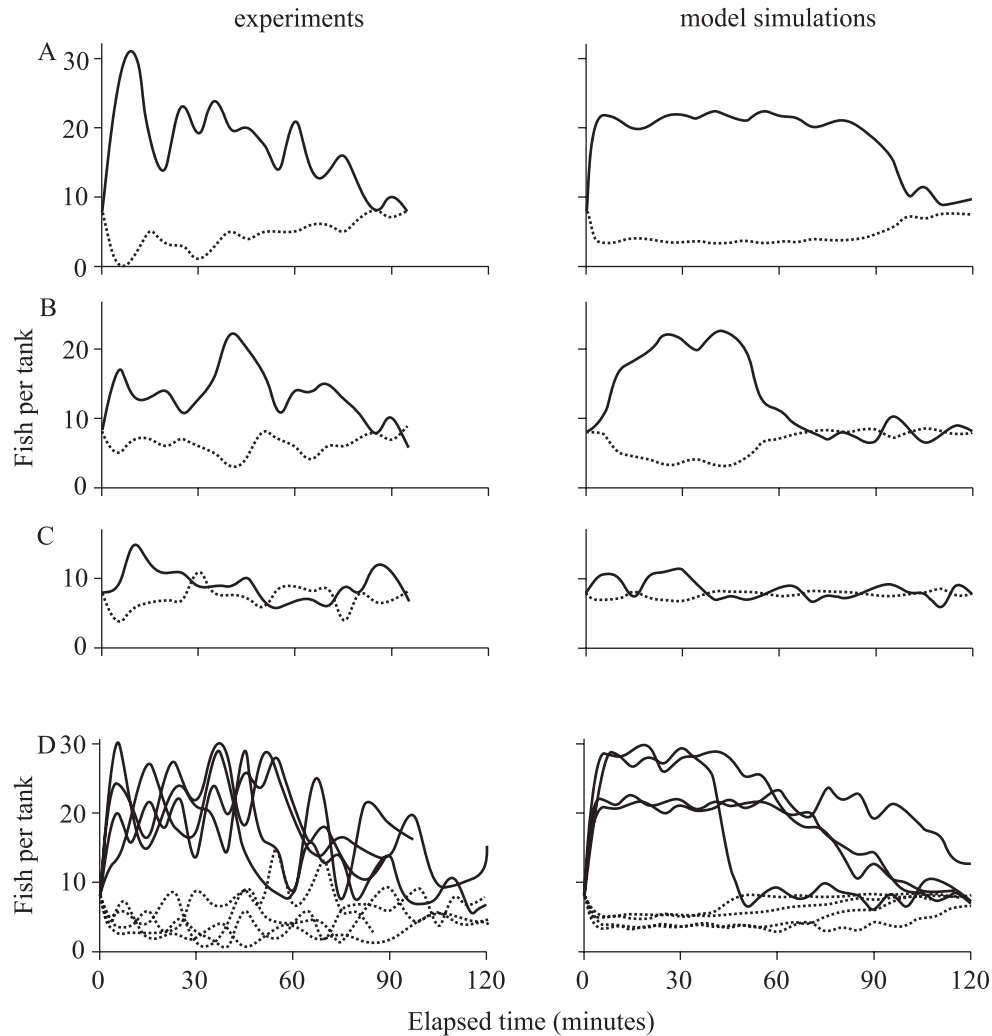


Fig. 5. Changes in the number of roach in the tank with a high (solid line) and in one of the tanks with a low (dotted line) initial *Daphnia* density during 2 h of dusk, from the moment the fish were transferred to the tanks from their daytime refuges until the time of sunset, in experiments (left) and model simulations (right) starting from the same initial *Daphnia* densities: (A) on the day of the first feeding session in expt 11 with four tanks when the *Daphnia* density was highest, particularly in the high-density tank; (B) one day after the first feeding session in expt 11; (C) two days after the first feeding session in expt 11, when the initial differences in *Daphnia* densities in the system were considerably reduced; (D) on the day of the first feeding session in expts 6 and 7 with eight tanks, and expts 16 and 17 with four tanks in the system.

between the high- and the low-density tanks had been substantially reduced. The density implying the highest risk also declined when the number of fish in the system was reduced (Table 3).

**Birth and death rates in *Daphnia***—The slight rise in birth rate of experimental *Daphnia* that accompanied increasing population density (Fig. 6A) was completely offset by a much greater increase in death rate (Fig. 6B), which resulted in a drastic decline in the growth rate of a *Daphnia* population as its density increased (Fig. 6C) which resulted from high death rates that were not compensated by birth rate, particularly at high density levels where predation was stronger (see Fig. 3). The observed changes in these

parameters were all in line with the expected increase in individual risk with an increasing prey density.

**Individual risk in *Daphnia* prey as a result of functional and numerical responses in fish**—It was reasoned that the individual risk of *Daphnia* at different density levels could be assessed from the data on the capture rate for all fish in a given tank (combined functional and numerical aggregational responses at different prey densities in Fig. 7B). Such integrated capture rates (specific for each prey density level) were obtained from the experimental data (circles in Fig. 7B) and from simulations using the model (small circles composing a line in Fig. 7B). They were also used to calculate the individual fish capture rates (Fig. 7A).

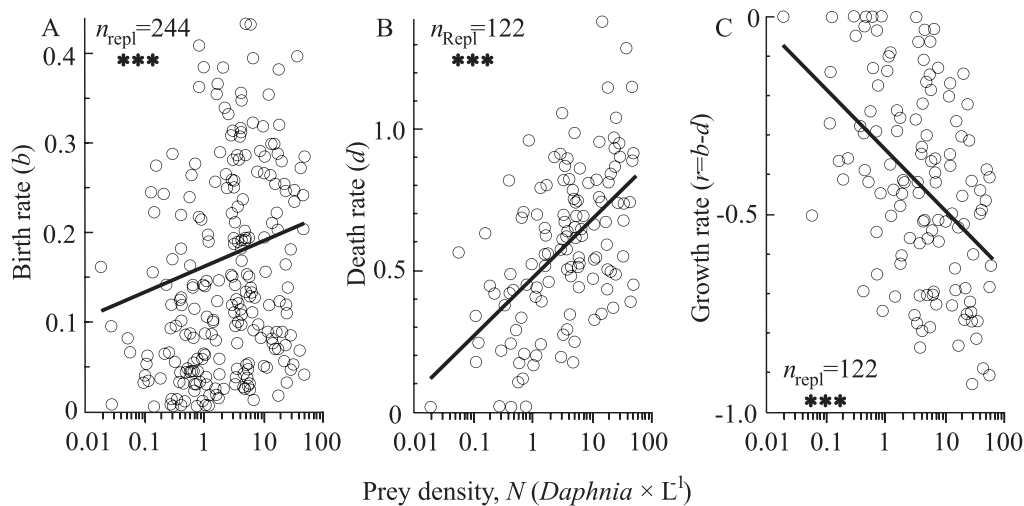


Fig. 6. (A) Birth, (B) death, and (C) growth rates in *Daphnia* at different density levels (circles for data points, solid lines indicating best fits) calculated for each of the three or four experimental nights from all 24 experiments performed between July 2007 and August 2009 (Table 1). The regression slopes are different from 0 for the growth ( $p < 0.0001$ ,  $F_{1,122} = 30.3$ ) and death ( $p < 0.0001$ ,  $F_{1,122} = 47.8$ ) rates (also for birth rate at  $p < 0.0003$ ,  $F_{1,244} = 16.2$ ).

When the ordinate value of each data point in Fig. 7A or 7B, derived experimentally or through simulations, was divided by the respective density of *Daphnia* prey, a value of individual risk for a *Daphnia* at a given density level was obtained on the abscissa that results from the presence of a single fish and its functional response to prey abundance (Fig. 7C), and the individual risk of a *Daphnia* prey resulting from the joint effect of the functional and numerical responses (Fig. 7D), for each of the different prey density levels.

The risk resulting from the functional response of a single fish (Fig. 7C) was found to be highest at the intermediate abundance of 3 *Daphnia*  $L^{-1}$ , and declined similarly as the prey density became either lower or higher. The risk as a result of the functional response combined with the numerical response (Fig. 7D) was highest at a prey abundance an order of magnitude higher (around 30 *Daphnia*  $L^{-1}$ ), and did not decline much at densities approaching the carrying capacity of most aquatic habitats. Moreover, this decline was slight—compared with the functional response alone, the risk remained huge even at very high prey abundance.

The model simulations showed that the risk in the high-prey-density tank became higher as the difference in prey density between the high- and the low-density tanks increased (Table 3). The experimental data, shown by filled circles in Fig. 7D, as well as the outcome of model simulations, shown as an aggregation of small circles, represent the lowest prey densities in low-density tanks (below 1 *Daphnia*  $L^{-1}$ ). The experimental data for higher prey densities in low-density tanks (the empty circles in Fig. 7D) indicated lower risk. The simulations also revealed that variability in risk increased dramatically with the density increase in the low-density tanks (Table 3), which was an evident effect of weaker motivation of fish to remain in the higher-density tank once the difference between the high- and the low-density tanks had been

substantially reduced. The density implying the highest risk also declined when the number of fish in the system was reduced (Table 3).

*Prey size selectivity in fish*—The experimental roach fed selectively with a preference for adult *Daphnia* (Fig. 8A,B) that was even stronger for prey individuals with eggs in their brood cavity (Fig. 8C). This selectivity declined as the prey density increased (Jacobs' index moving towards zero from its negative and positive values for juveniles and adults, respectively). The regression slopes in Fig. 8A–C are different from 0 at  $p < 0.015$ , the slopes being steeper for the egg-free adults and those with eggs than for the juveniles at  $p < 0.0012$  and  $p < 0.0001$ , respectively ( $F_{1,122} = 10.74$  and  $F_{1,122} = 26.15$ , analysis of covariance).

The selectivity for adult *Daphnia* at low prey densities was also apparent as a stronger reduction in the fraction of adults at low than at high prey density levels. The ratio of the reduction in the contribution of adult *Daphnia* (along the ordinate) to the reduction in prey density (along the abscissa) in experiments (Fig. 8D), and in model simulations starting at identical initial prey densities (Fig. 8E), was greater at high than at low *Daphnia* prey densities. The slope of the regression of the percentage reduction in the initial value of this fraction on the initial prey density was different from 0 at  $p < 0.0118$  ( $F_{1,120} = 6.56$ ,  $n_{\text{replicates}} = 120$ ) for all experimental nights, but only for the first night and for the data from the high-density tank in simulations using the model at  $p < 0.0339$  ( $F_{1,146} = 5.17$ ,  $n_{\text{repl}} = 46$ , ANCOVA). The data from low-density tanks were often obscured by a high recruitment rate exceeding fish-induced mortality that was usually much lower at low than at high prey densities (note the frequent upwardly pointing gray arrows in Fig. 8E). A more thorough examination of the effects of the abundance of *Daphnia* prey, its spatial heterogeneity, and the dimensions of the confined space available to a foraging roach on its selectivity for adult



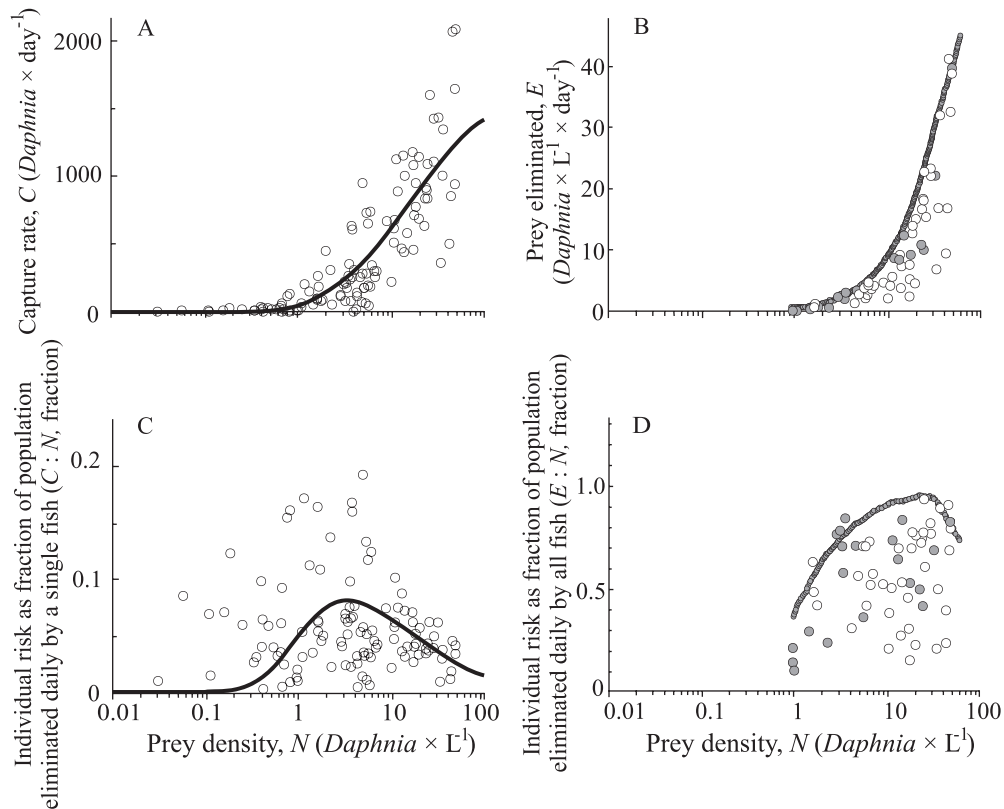


Fig. 7. (A) Fish capture rates, (B) combined functional and numerical “aggregational” responses of fish, and (C,D) their respective effects on *Daphnia* prey individual risk at different density levels, each point reflecting the effect of fish in a single overnight feeding session: (A) functional response of roach in tanks with high and low densities of *Daphnia* prey, computed as the capture rate divided by the mean number of fish in the tank during the feeding session—experimental data shown as circles ( $n_{repl} = 120$ ) and the best fit functional response (defined in *The model and simulations*) shown as a line; (B) integrated capture rate by all fish in the tank with a high *Daphnia* prey initial density reflecting the combined effect of the functional and numerical “aggregational” responses and shown as circles calculated from experimental data (filled when densities in the low-density tanks are  $< 1$  *Daphnia*  $L^{-1}$ ,  $n_{repl} = 60$ ), and as a line composed of 1000 small circles, each resulting from one model simulation corresponding to 24 h of feeding when the prey density in the low-density tanks is 0.5 *Daphnia*  $L^{-1}$ ; (C) *Daphnia* prey individual risk in the tanks with high and low *Daphnia* prey densities resulting from the functional response alone, shown as the experimental values of the capture rate divided by *Daphnia* density,  $y/x$ , for each data point ( $n_{repl} = 120$ , circles) and as a line representing values of the functional response divided by the *Daphnia* density,  $y/x$ ; (D) *Daphnia* prey individual risk in the tank with a high density of *Daphnia* prey resulting from both the functional and numerical “aggregational” responses of all 64 fish in the system computed as in C, and shown as circles calculated from experimental data (in an analogous manner to B), and as a line composed of 1000 small circles, each resulting from one model simulation (as in B).

*Daphnia* shall be presented in a separate paper (P. Maszczyk and Z. M. Gliwicz unpubl.).

**Fish velocities and capture rates in different temperature ranges**—In spite of the great variability of the data set, the velocity of fish movement determined from the video recordings made during either the first 30 min or the initial 2 h of the feeding sessions was found to decline with an increase in the *Daphnia* prey density, at  $p < 0.0001$  ( $n_{repl} = 378$ ,  $F_{1,378} = 39.6$ ) and  $p < 0.0001$  ( $n_{repl} = 820$ ,  $F_{1,820} = 23.4$ ), respectively, with the latter shown both as a data plot and as the mean ( $\pm 1$  standard deviation [SD]) for each of

three prey density ranges, each grouping a similar number of data points (Fig. 8A).

The high level of variation in the velocity of foraging fish was probably an effect of the frequent changes in the velocity of individual fish as they shift between less selective harvesting at lower speed and more selective foraging for adult *Daphnia* carrying eggs in their brood cavity (as suggested by data in Fig. 6). However, some of the variability could be attributed to temperature changes within and between experiments run at different times (from July to September; Table 1). Separation of the data into two temperature ranges, 16–18°C and 18–22°C,

Table 3. The results of model simulations showing change in *Daphnia* individual risk in the high-prey-density tank (prey maximum risk) and its variability in the 10–12 *Daphnia* L<sup>-1</sup> density range (% variance) resulting from the effect of fish when their functional responses and their numerical responses in space are combined at different prey densities in the low-density tanks (0.5, 1.5, and 4.5 *Daphnia* L<sup>-1</sup>) and a different mean number of fish per tank (0.5, 2, and 8), according to the model simulations. Note the higher variability with the difference in the number of fish (much greater difference with a few fish) rather than the difference in prey density between high- and low-density tanks (much greater when the difference was high at the lowest density in low-density tanks). The relative variability (ratio of standard deviation to mean value) of individual risk in the tank with high *Daphnia* density (10 ind. L<sup>-1</sup>) was higher when the overall *Daphnia* distribution in all tanks was more uniform (smaller difference in density between the high- and the low-density tanks, *F*-test,  $n_{\text{repl}} = 2000$ ,  $p < 0.0001$ ). Three comparisons between treatments with different densities in the low-density tank (0.5, 1.5, and 4.5) and for each number of fish per tank (0.5, 2, and 8) were tested.

Prey density in low-density tanks (ind. L <sup>-1</sup> )	Fish per tank	Prey maximum risk (% probability of being captured per day)	Prey density at maximum risk (ind. L <sup>-1</sup> )	Relative variability at 10 ind. L <sup>-1</sup>
0.5	0.5	23.8	3.6	0.040
0.5	2	64.3	5.8	0.018
0.5	8	95.0	28.2	0.001
1.5	0.5	18.7	5.3	0.046
1.5	2	53.8	6.5	0.018
1.5	8	88.7	24.5	0.004
4.5	0.5	8.1	4.5	0.084
4.5	2	28.9	9.7	0.034
4.5	8	80.3	15.8	0.012

revealed the strong effect of temperature on the cruising velocity of fish: the elevation of two regression lines was different for the first 30 min and the first 2 h of the feeding session at, respectively,  $p < 0.0001$  ( $n_{\text{repl}} = 378$ ,  $F_{14,378} = 78.4$ ) and  $p < 0.0001$  ( $n_{\text{repl}} = 820$ ,  $F_{18,820} = 72.1$ , ANCOVA). Moreover, two-way ANOVA showed that the decline in velocity with increasing prey density was significant at  $p < 0.0001$  ( $F_{2,820} = 41.3$ ), the effect of temperature was significant at  $p < 0.0001$  ( $F_{1,820} = 77.3$ ), and the prey density  $\times$  temperature interaction was significant at  $p < 0.0006$  ( $F_{1,820} = 75.0$ ), suggesting that the effect of temperature on velocity was stronger at lower than at higher *Daphnia* densities.

The effect of temperature was also detected as a difference in fish capture rates in the two aforementioned temperature ranges (Fig. 9C). This difference was most apparent when shown as the mean ( $\pm 1$  SD) for each of three prey density ranges, each grouping a similar number of data points (Fig. 9D), with two-way ANOVA revealing an increase in capture rate with increasing *Daphnia* density (significant at  $p < 0.0001$ ,  $F_{2,820} = 84.3$ ), and the effect of temperature significant at  $p < 0.0161$  ( $F_{2,820} = 6.0$ ) with a nonsignificant prey density  $\times$  temperature interaction.

## Discussion

*Zooplankton patchiness: Adaptive or maladaptive?*—The results of experiments and simulations described in this paper suggest that the individual risk for zooplankton (such as medium-sized *Daphnia*) coexisting with planktivorous fish (such as roach) is greater at sites of higher than lower population density, at least until the overall density grows beyond 30 ind. L<sup>-1</sup>, when the high-density refuge may prevail. The apparent increase in individual risk with densities of *Daphnia* prey up to 20 ind. L<sup>-1</sup> is an effect of faster prey density reduction by fish where prey is more abundant, which results in a sigmoid functional response of each fish to increasing prey abundance, and the swift

translocation of fish to more proficient sites. This is apparent as a strong numerical response of the predator in space, with most fish aggregating at the site with the highest prey density level. The strength of this response becomes greater as the difference in prey abundance between sites increases, and the effect of this response on the prey density becomes stronger as the number of fish in the system is increased. Such a combination of functional and numerical responses in space makes aggregation a maladaptive strategy when the overall prey population density is not very high and planktivorous fish are abundant and active. Such a mechanism may explain the monotonous horizontal uniformity in the distribution of zooplankton in the pelagic zone of lakes and oceans that is so well known from sampling studies and is evident from the scarcity of reports of long-lasting zooplankton aggregations (Folt and Burns 1999).

However, according to  $> 1000$  simulations performed with our model, this situation might change in sites with very high overall prey abundance and low fish availability, where the prey individual risk is reduced (Fig. 7D; Table 3), thus making aggregation behavior adaptive, and the concept of a high-density antipredation refuge feasible. Where the overall prey density is beyond 30 *Daphnia* L<sup>-1</sup>, this can permit the formation of much denser local prey aggregations, with densities that are increased by 2–3 orders of magnitude, that are typically defined as zooplankton swarms (Ambler 2002). This may explain why swarming could be induced by fish kairomone treatment in *Daphnia* propagated at high density in the laboratory (Pijanowska and Kowalczyński 1997). It may also explain why aggregation by cladocerans has been occasionally observed in the field as dense swarms of *Bosmina* (Jakobsen and Johnsen 1988), *Daphnia* (Kvam and Kleiven 1995), or *Scapholeberis* (De Meester et al. 1991) that are always found in the middle of the day, and in small lakes or ponds, but not in larger lakes (where densities of a medium-sized *Daphnia* beyond 30 ind. L<sup>-1</sup> are uncommon, and densities orders of magnitude higher are never reported).

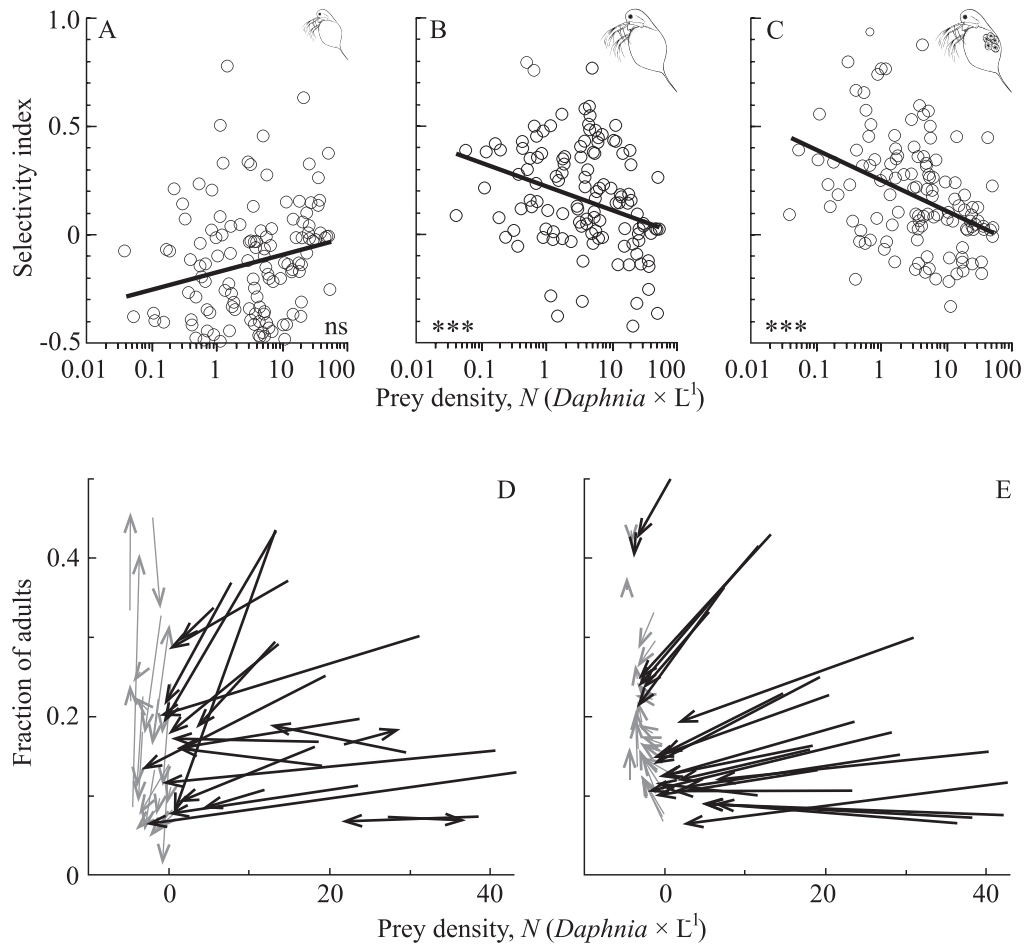


Fig. 8. Prey size selection by experimental fish shown using Jacobs' (1974) selectivity index values for (A) *Daphnia* juveniles, (B) egg-free adults, and (C) adults with eggs in their brood cavity at different *Daphnia* prey densities (circles for data points, solid lines indicating best fits), calculated for each of 114 experimental nights from all 24 experiments performed between July 2007 and August 2009 (Table 1), the asterisks indicating a significant slope at  $p < 0.001$ ). (D) Selectivity for adult *Daphnia* is also described by the ratio of the reduction in the adults' contribution (on the ordinate) to the decrease in prey density (on the abscissa) in experiments and (E) by model simulations starting at identical initial *Daphnia* densities: the black and gray arrows represent the tanks with high and low initial prey densities, respectively (the more vertical the arrow, the stronger the selection for the adults).

There are additional reasons why in a small lake, and in the middle of the day, the risk from visual predators may be reduced by aggregating to make it even more adaptive: (1) the numerical response of planktivorous fish in space is limited by the small size of the fish population residing in such a small habitat (fewer fish can assemble at the location which was also the case in our experimental setup); (2) the risk for a cladoceran prey of joining an aggregation is further reduced by the reluctance of individual fish to leave their daytime refuge in deeper strata or among littoral vegetation (in this case, the mass numerical response becomes reduced to a few fish that risk foraging outside the antipredation window—Clark and Levy 1988; Gliwicz et al. 2006); (3) feeding by the small number of the hungriest fish within such an aggregation would probably be very inefficient with their attention being mainly focused on the mortal risk from visually feeding piscivores rather than on the opportunity offered by the abundant prey (such prioritization in fish behavior was first demonstrated in studies with a virtual kingfisher (*Alcedo atthis*) by Milinski

and Heller 1978; Heller and Milinski 1979); and (4) small lakes and ponds are mostly shallow, thus precluding the use of diel vertical migrations as an alternate behavioral antipredation defense in zooplankton (De Meester et al. 1999). Moreover, swarming sensu Ambler (2002) may also represent an effective defensive behavior in *Daphnia* against predation by invertebrates such as phantom midge (*Chaoborus*) larvae (Kvam and Kleiven 1995). These invertebrates lack great mobility—in contrast to fish—thus precluding the massive numerical response in space exhibited by roach in this study. Their functional response is much weaker since each invertebrate predator is satiated by a single prey rather than the hundreds of prey ingested per hour by our experimental roach.

Aggregating may occasionally become adaptive for *Daphnia* in large lakes where it can briefly occur in exceptionally high densities during the spring clear-water phase. However, this period is usually short-lasting and followed by the midsummer decline, when highly abundant *Daphnia* are abruptly reduced in number (Threlkeld 1979;

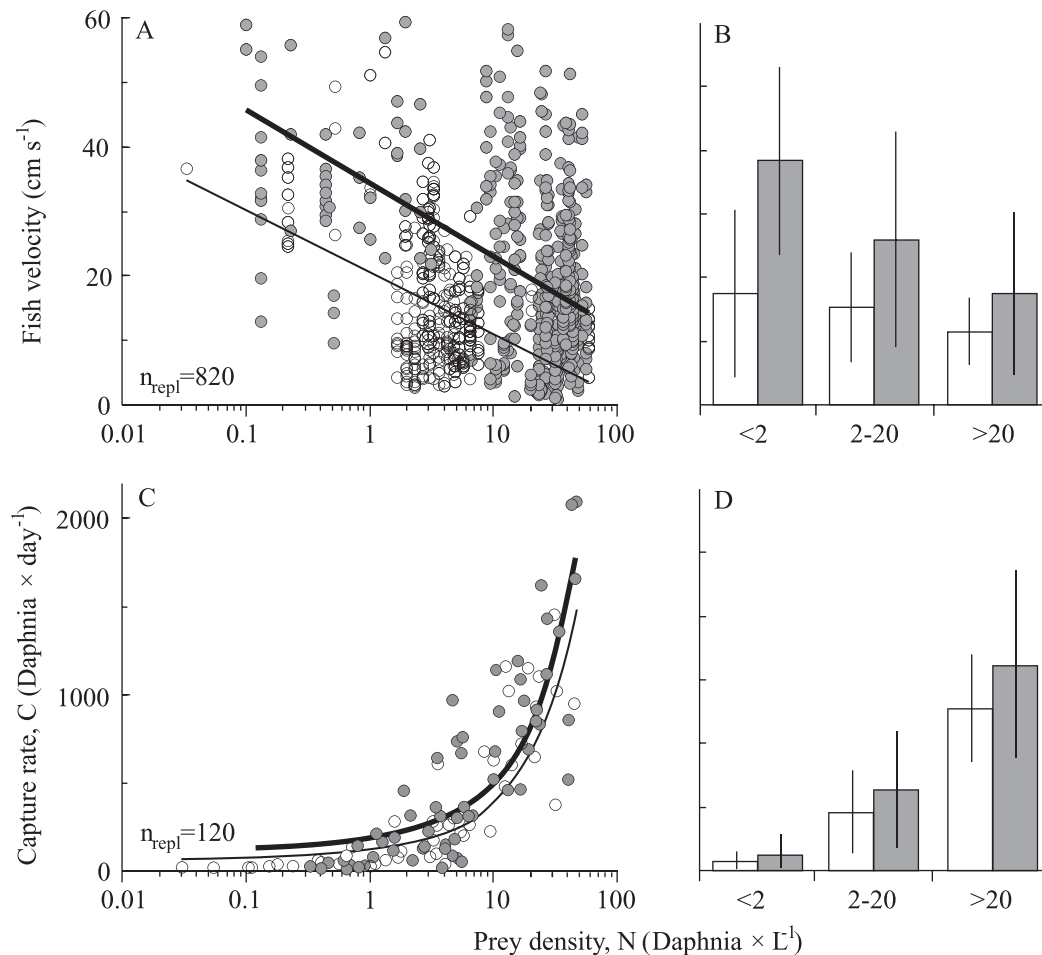


Fig. 9. (A,B) Cruising velocity and (C,D) capture rate of experimental fish when foraging on different densities of *Daphnia* prey during the two initial hours of the feeding session in the temperature ranges of 16–18°C (thin line, empty circles, unshaded bars) and 18–22°C (thick line, filled circles, shaded bars) shown either as (A,C) plotted data with lines indicating best fit or (B,D) as the mean value ( $\pm 1$  SD) for each of three prey-density ranges with a similar number of data points.

Sommer et al. 1986, 2012), with individual risk again becoming greater at sites of higher prey density, with aggregation no longer an adaptive risk-avoidance strategy. Typically, previous studies on aggregation as an antipredation defense in cladocerans have concentrated on the adaptive significance of different patterns of individual behavior within an aggregation rather than that of joining an aggregation. Within an aggregation, animals may reduce the threat of predation by vigilance sharing (Krebs 1974) or predator confusion (Milinski and Heller 1978), and also by a collective synchronic motion, but none of these options is available or relevant to solitary individuals within a dispersed prey population.

Synchronous movement of aggregated prey has frequently been suggested to play a role in defense against visual predators, not only in flocks of birds and schools of fish, but also in swarms of zooplankton such as *Daphnia* (Jensen et al. 1998; Szulkin et al. 2006). Its adaptive significance has recently been confirmed by Ioannou and colleagues (2012). As in the earlier study of Brewer and Coughlin (1995), they eliminated predator mortal effects on their prey by using virtual prey. This allowed them to

control the pure effects of predator confusion when images of such prey were offered to a planktivorous fish (bluegill sunfish [*Lepomis macrochirus*]) in different group size combinations, each group being composed of individuals with or without movement synchronization (behaviorally homogenous and heterogeneous prey categories), with larger groups of more synchronized prey being attacked least often. It seems clear from the results of Ioannou et al. (2012) that while within an aggregation, a planktonic prey should join a coherent group of conspecifics and travel in the same direction as its near neighbors to be at least as safe as other members of the group. This, however, does not imply that in spite of costly efforts to behave like the other members of the group, such a prey would be safer than a solitary prey in a site with a low prey population density. Indeed, its individual risk would probably be dramatically greater due to the combined effects of the functional and numerical aggregational responses of planktivorous fish to a patchy horizontal distribution of the prey population in space.

The individual risk of *Daphnia* prey, assessed as the fraction of its density eliminated daily by fish, was found to



be amplified with an increase in prey density, but only up to a critical point (Fig. 7D). This suggests that joining an aggregation would be advantageous at a density well above this critical point (in accordance with the concept of “high-density refuge” of Milinski and Heller 1978; Jakobsen and Johnsen 1987; Pijanowska and Kowalczewski 1997), whereas joining much below this point would be disadvantageous (in accordance with the concept of “low-density refuge” of Young et al. 1994; Gliwicz et al. 2012), thus indicating that these two notions are not contradictory. Both the critical point in prey density (at the maximum risk) and the prey maximum risk (up to 95% probability of being captured per day) depend on the difference between the prey densities at the sites of high and low prey density, as well as on the number of fish in the system (Table 3). Both of these parameters make swarming behavior an unreliable antipredation strategy in large lakes and oceans.

The numerical response of a predator population in space becomes apparent only in the context of the sigmoidality of an individual predator’s aggregational functional response to a patchy prey distribution. The findings of the present study reveal the swiftness of such a response in highly mobile planktivorous fish known for their long-distance evening forays offshore to feed on more abundant *Daphnia* prey, far away from their daytime refuges in the littoral vegetation. The occurrence of this foraging behavior in common cyprinid species such as the American golden shiner (Hall et al. 1979) and European roach (Gliwicz et al. 2006) may be the primary reason why *Daphnia* aggregations are rarely observed in American and European lakes, despite the fact that there are also other powerful biological and physical drivers of zooplankton patchiness, such as the need to seek out food patches and mates (Folt and Burns 1999), and the effect of upwelling currents, e.g., in the Langmuir circulation (George and Edwards 1973). Each of the experimental *Daphnia* “aggregations” in one of the interconnected tanks used in our experiments was considerably reduced during the first-night feeding session by fish that quickly assembled in the tank with the highest density of *Daphnia* prey. This happened in spite of the rather small total number of fish allowed to feed in the experimental system; hence the effect may be expected to be much stronger in large lakes where the potential number of fish that can relocate to such an aggregation is orders of magnitude higher. In our experiments with a total of 64 fish in eight tanks, the risk for a *Daphnia* prey within a high-density population (20 ind. L<sup>-1</sup>) increased from 0.04 (with a single fish) to 0.95, i.e., the likelihood of being captured during the first-night fish feeding session increased from 4% to 95%.

Two main conclusions emerge from the present study. Although a planktonic prey within an aggregation of conspecifics might be more secure from predator attack, when its movements are synchronized with those of its nearest neighbors, this is possible only at high prey population densities that allow at least a few individuals to form a synchronic swarm. In experiments with virtual prey reported by Ioannou et al. (2012), the first prey chosen by real fish was not one of the four present in a swarm, but a single prey in the neighborhood. A prey that joins an

aggregation and coordinates its movements with conspecifics does not necessarily become more secure than a single prey far away from the aggregation, since aggregations are more readily detected by a visual predator than solitary prey, due to their broader visual angle. This was also demonstrated by Ioannou and Krause (2008) and Ioannou et al. (2009) in experiments with real sunfish (*Lepomis macrochirus*) and real *Daphnia* prey. Moreover, the risk-dilution effect of joining an aggregation may be diminished by the increased probability of attack by a foraging fish that can detect a prey aggregation more easily than a solitary prey (Turner and Pitcher 1986; Krause et al. 1998). In addition, aggregated prey would provide foraging fish with a much higher net energy gain per unit of time in spite of the fact that the cost of each capture might be higher than the cost of capturing solitary prey.

*Different modes of feeding and the nature of prey size selection by fish in locations with patchy prey distribution—* The model used in this study has permitted verification of the experimental data with respect to the availability of both a low- and a high-prey-density antipredation refuge to zooplankton prey (Fig. 7) when the overall fish abundance is sufficiently high and their ability to migrate is unlimited (Fig. 4). It has also provided support for the assumption of two different modes of feeding in planktivorous fish, i.e., low-speed nonselective harvesting and high-speed size-selective searching, and the switch between them according to the spatial distribution and density of the prey resources. This assumption stemmed from previous reports of great variability in the gut contents of juvenile roach collected from lakes in the same evening seine haul, with some intestines loaded with one prey category, and others with a mixture of cladoceran and copepod species (Gliwicz 2003; Gliwicz et al. 2006), suggesting that fish may feed more or less selectively on zooplankton prey. Similar bimodality of feeding behavior was also detected in roach feeding on a single-species prey population in the present study: *Daphnia* counts showed that the roach were more or less selective for bigger *Daphnia* adults, particularly those with eggs in their brood cavity. Furthermore, the selection for ovigerous females was stronger at low than at high *Daphnia* density, which contradicts many earlier observations of stronger selectivity at high than at low prey density levels (Werner and Hall 1974), with the difference between individual studies stemming from the different spatial scales and thus the lesser or greater ability of fish to select locations with more or less abundant prey (P. Maszczyk and Z. M. Gliwicz unpubl.). The results of the present study support the hypothesis that a foraging fish may temporarily shift its feeding mode between low-speed ranging and high-speed searching (Coughlin et al. 1992), or low-speed harvesting of small but abundant prey and high-speed hunting for scarcer but larger ovigerous females when their relative abundance provides a higher net energy gain (Gliwicz et al. 2010). The frequency of such shifting is likely to increase as the difference between prey densities at different sites becomes smaller, i.e., at more patchy prey distribution. This seems to be reflected in our data on the distribution of fish velocities at different prey density levels, which lacks any

clear grouping for high and low velocities at low and high densities of *Daphnia* prey, respectively (Fig. 9).

Although the model used in this study is not sufficiently mechanistic to predict the details of fish feeding behavior, such as fish velocities when harvesting or searching, the simulation results clearly show that even though faster movement consumes more energy (particularly at lower temperatures where water viscosity is higher), it is still more profitable at low densities of *Daphnia* prey due to the anticipation of higher profits achieved by locating the next aggregation sooner. The model simulations confirm the results of our experiments suggesting that a shift from low-velocity harvesting to high-velocity hunting for egg-carrying females should be expected where prey densities are low. On one hand, an increased velocity assists the search for the most profitable patch of prey, while on the other, it results in higher costs due to the required post-capture accelerations that are only partly compensated for by the higher encounter rate. Then, as suggested previously (Gliwicz et al. 2010), and assumed in our model, the energy gained from capturing a small juvenile prey may not be sufficient to cover the cost of post-capture acceleration, and therefore juvenile individuals are ignored.

#### Acknowledgments

We thank A. Hankiewicz for assistance with the experimental work, E. Rutkowska for help with artwork, S. Sarma, S. Nandini, J. R. Gittins, and two anonymous referees for valuable comments on subsequent drafts of this manuscript. This research was supported by grants 2 P04F 068 27, 6P04F01921, and 2P04G01430 to Z.M.G., and N N304 067336 to P.M. from the State Committee for Scientific Research, Poland, and two grants from The Foundation for Polish Science to Z.M.G. Moreover, D.W. and J.J. were, respectively, a supervisor and a Ph.D. student in the International Ph.D. Projects Programme of the Foundation within the Innovative Economy Operational Programme 2007–2013 (Ph.D. Programme for Mathematical Methods in Natural Sciences).

#### References

- AMBLER, J. W. 2002. Zooplankton swarms: Characteristics, proximal cues and proposed advantages. *Hydrobiologia* **480**: 155–164, doi:10.1023/A:1021201605329
- BARTOŃ, K. A., AND T. HOVESTADT. 2013. Prey density, value, and spatial distribution affect the efficiency of area-concentrated search. *J. Theor. Biol.* **316**: 61–69, doi:10.1016/j.jtbi.2012.09.002
- BOTTRELL, H. H., AND OTHERS. 1976. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norw. J. Zool.* **24**: 419–456.
- BREWER, M. C., AND J. N. COUGHLIN. 1995. Virtual predator: A novel approach to the investigation of an aquatic predator-prey interactions. *Mar. Freshw. Behav. Physiol.* **26**: 91–100, doi:10.1080/10236249509378931
- ČECH, M., AND J. KUBEČKA. 2002. Sinusoidal cycling swimming pattern of reservoir fishes. *J. Fish Biol.* **61**: 456–471, doi:10.1111/j.1095-8649.2002.tb01577.x
- CHARNOV, E. L. 1976. Optimal foraging: The marginal value theorem. *Theor. Popul. Biol.* **9**: 129–136, doi:10.1016/0040-5809(76)90040-X
- CLARK, C. W., AND D. A. LEVY. 1988. Diel vertical migrations by juvenile sockeye salmon and the antipredation window. *Am. Nat.* **131**: 271–290, doi:10.1086/284789
- COUGHLIN, D. J., J. R. STRICLER, AND B. SANDERSON. 1992. Swimming and search behaviour in clownfish, *Amphiprion perideraion*, larvae. *Anim. Behav.* **44**: 427–440, doi:10.1016/0003-3472(92)90053-C
- DALY, D., A. D. HIGGINSON, D. CHEN, G. D. RUXTON, AND M. P. SPEED. 2012. Density-dependent investment in costly antipredator defences: An explanation for weak survival benefit of group living. *Ecol. Lett.* **15**: 576–583, doi:10.1111/j.1461-0248.2012.01770.x
- DE MEESTER, L., P. DAWIDOWICZ, E. VAN GOOL, AND C. J. LOOSE. 1999. Ecology and evolution of predator-induced behavior of zooplankton: Depth selection behavior and diel vertical migration, p. 160–176. In R. Tollrian and C. D. Harvel [eds.], *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton Univ. Press.
- , S. MAAS, K. DIERCKENS, AND H. J. DUMONT. 1991. Habitat selection and patchiness in *Scapholeberis*: Horizontal distribution and migration of *S. mucronata* in a small pond. *J. Plankton Res.* **15**: 1129–1139, doi:10.1093/plankt/15.10.1129
- FOLT, C. L., AND C. W. BURNS. 1999. Biological drivers of zooplankton patchiness. *Trends Ecol. Evol.* **14**: 300–305, doi:10.1016/S0169-5347(99)01616-X
- GEORGE, D. G., AND R. W. EDWARDS. 1973. *Daphnia* distribution within Langmuir circulations. *Limnol. Oceanogr.* **18**: 798–800, doi:10.4319/lo.1973.18.5.0798
- GILLIAM, J. F., AND D. H. FRASER. 1988. Resource depletion and habitat segregation by competitors under predation hazard, p. 173–188. In B. Ebenman and L. Persson [eds.], *Size-structured populations: Ecology and evolution*. Springer-Verlag.
- GLIWICZ, Z. M. 1990. Food thresholds and body size in cladocerans. *Nature* **343**: 638–640, doi:10.1038/343638a0
- . 2003. Between hazards of starvation and risk of predation: The ecology of offshore animals. *International Ecology Institute*. Oldendorf/Luhe.
- , P. MASZCZYK, AND W. USZKO. 2012. Enhanced growth at low population density in *Daphnia*: The absence of crowding effects or relief from visual predation? *Freshw. Biol.* **57**: 1166–1179, doi:10.1111/j.1365-2427.2012.02783.x
- , J. SLON, AND I. SZYNKARCZYK. 2006. Trading safety for food: Evidence from gut contents in roach and bleak captured at different distances offshore from their daytime littoral refuge. *Freshw. Biol.* **51**: 823–839, doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01530.x
- , E. SZYMANSKA, AND D. WRZOSEK. 2010. Body size distribution in *Daphnia* populations as an effect of prey selectivity by planktivorous fish. *Hydrobiologia* **643**: 5–19, doi:10.1007/s10750-010-0125-y
- , AND D. WRZOSEK. 2008. Predation-mediated coexistence of large- and small-bodied *Daphnia* at different food levels. *Am. Nat.* **172**: 358–374, doi:10.1086/589890
- HALL, D. J., AND OTHERS. 1979. Diel foraging behaviour and prey selection in the golden shiner (*Notemigonus chryssoleucas*). *J. Fish. Res. Board Can.* **36**: 1029–1039, doi:10.1139/f79-145
- HAMILTON, W. D. 1971. Geometry for the selfish herd. *J. Theor. Biol.* **31**: 295–311, doi:10.1016/0022-5193(71)90189-5
- HELLER, R., AND M. MILINSKI. 1979. Optimal foraging in sticklebacks on swarming prey. *Anim. Behav.* **27**: 1127–1141, doi:10.1016/0003-3472(79)90061-7
- HOLLING, C. S. 1959. Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Can. Entomol.* **91**: 385–398, doi:10.4039/Ent91385-7
- IOANNOU, C. C., V. GOTTAL, AND I. D. COUSIN. 2012. Predatory fish selects for coordinated collective motion in virtual prey. *Science* **337**: 1212–1215, doi:10.1126/science.1218919
- , AND J. KRAUSE. 2008. Searching for prey: The effects of group size and number. *Anim. Behav.* **75**: 1383–1388, doi:10.1016/j.anbehav.2007.09.012

- , L. J. MORRELL, G. D. RUXTON, AND J. KRAUSE. 2009. The effect of prey density on predators: Conspicuousness and attack success are sensitive to spatial scale. *Am. Nat.* **173**: 499–506, doi:10.1086/597219
- JACKSON, A. L., S. BROWN, T. N. SHERRATT, AND G. D. RUXTON. 2005. The effects of group size, shape and composition on ease of detection of cryptic prey. *Behaviour* **142**: 811–826, doi:10.1163/1568539054729105
- JACOBS, J. 1974. Quantitative measurements of food selection; a modification of the forage ratio and Ivlev's selectivity index. *Oecologia* **14**: 413–417, doi:10.1007/BF00384581
- JAKOBSEN, P. J., AND G. H. JOHNSEN. 1987. The influence of predation on horizontal distribution of zooplankton species. *Freshw. Biol.* **17**: 501–507, doi:10.1111/j.1365-2427.1987.tb01070.x
- , AND ———. 1988. Size-specific protection against predation by fish in swarming waterfleas *Bosmina longispina*. *Anim. Behav.* **36**: 986–990, doi:10.1016/S0003-3472(88)80057-5
- JANSSSEN, J. 1981. Searching for zooplankton just outside Snell's window. *Limnol. Oceanogr.* **26**: 1168–1171, doi:10.4319/lo.1981.26.6.1168
- JENSEN, K. H., P. J. JAKOBSEN, AND O. T. KLEIVEN. 1998. Fish kairomone regulation of internal swarm structure in *Daphnia pulex*. *Hydrobiologia* **369**: 123–127, doi:10.1023/A:1003233728870
- KRAUSE, J., G. D. RUXTON, AND D. RUBENSTEIN. 1998. Is there always an influence of shoal size on predator hunting success? *J. Fish Biol.* **52**: 494–501, doi:10.1111/j.1095-8649.1998.tb02012.x
- KREBS, J. R. 1974. Colonial nesting and social feeding as strategies for exploiting food resources in the Great Blue Heron (*Ardea herodias*). *Behaviour* **51**: 99–134, doi:10.1163/156853974X00165
- KVAM, O. V., AND O. T. KLEIVEN. 1995. Diel horizontal migration and swarm formation in *Daphnia* in response to *Chaoborus*. *Hydrobiologia* **307**: 177–184, doi:10.1007/BF00032010
- LIMA, S. L. 2002. Putting predators back into behavioral predator-prey interactions. *Trends Ecol. Evol.* **17**: 70–75, doi:10.1016/S0169-5347(01)02393-X
- MAGURRAN, A. E., W. J. OULTON, AND T. J. PITCHER. 1985. Vigilant behaviour and school size in minnows. *Z. Tierpsychol.* **67**: 167–178, doi:10.1111/j.1439-0310.1985.tb01386.x
- MANATUNGE, J., AND T. ASAEDA. 1999. Optimal foraging as the criteria of prey selection by two centrarchid fishes. *Hydrobiologia* **391**: 223–240.
- MASZCZYK, P., AND M. BARTOSIEWICZ. 2012. Threat or treat: The role of fish exudates in the growth and life history of *Daphnia*. *Ecosphere* **3**: 91, doi:10.1890/ES12-00146.1
- MCNAMARA, J. M., AND A. I. HOUSTON. 1985. Optimal foraging and learning. *J. Theor. Biol.* **117**: 231–249, doi:10.1016/S0022-5193(85)80219-8
- MILINSKI, M., AND R. HELLER. 1978. Influence of a predator on the optimal foraging behaviour of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Nature* **275**: 642–644, doi:10.1038/275642a0
- PIJANOWSKA, J. 1994. Fish-enhanced patchiness in *Daphnia* distribution. *Verh. Int. Ver. Limnol.* **25**: 2366–2368.
- , AND A. KOWALCZEWSKI. 1997. Predators can induce swarming behaviour and locomotory responses in *Daphnia*. *Freshw. Biol.* **37**: 649–656, doi:10.1046/j.1365-2427.1997.00192.x
- PITCHER, T. J. 1986. The function of schooling behaviour in teleosts, p. 294–337. *In* T. J. Pitcher [ed.], *The behaviour of teleost fishes*. John Hopkins Univ. Press.
- PYKE, G. H., H. R. PULLIAM, AND E. L. CHARNOV. 1977. Optimal foraging: A selective review of theory and tests. *Q. Rev. Biol.* **52**: 137–154, doi:10.1086/409852
- SOMMER, U., AND OTHERS. 2012. Beyond the plankton ecology group (PEG) model: Mechanisms driving plankton succession. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **43**: 429–448, doi:10.1146/annurev-ecolsys-110411-160251
- , Z. M. GLIWICZ, W. LAMPERT, AND A. DUNCAN. 1986. The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in fresh waters. *Arch. Hydrobiol.* **106**: 433–471.
- STEPHENS, D. W., AND J. R. KREBS. 1986. *Foraging theory*. Princeton Univ. Press.
- SZULKIN, M., P. DAWIDOWICZ, AND S. I. DODSON. 2006. Behavioural uniformity as a response to cues of predation risk. *Anim. Behav.* **71**: 1013–1019, doi:10.1016/j.anbehav.2005.05.027
- THRELKELD, S. T. 1979. The midsummer dynamics of two *Daphnia* species in Wintergreen Lake, Michigan. *Ecology* **60**: 165–179, doi:10.2307/1936478
- TURNER, G. F., AND T. J. PITCHER. 1986. Attack abatement: A model for group protection by combined avoidance and dilution. *Am. Nat.* **128**: 228–240, doi:10.1086/284556
- WERNER, E. E., AND D. J. HALL. 1974. Optimal foraging and the size selection of prey by the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Ecology* **55**: 1042–1052, doi:10.2307/1940354
- YOUNG, S., P. J. WATT, J. P. GROVER, AND D. THOMAS. 1994. The unselfish swarm? *J. Anim. Ecol.* **63**: 611–618, doi:10.2307/5227

Associate editor: Thomas Kjørboe

Received: 18 January 2013

Accepted: 13 May 2013

Amended: 15 May 2013

## **VI.8. Załącznik 8**

Maszczyk P. i Gliwicz Z.M. 2014 – Selectivity by planktivorous fish at different prey densities, heterogeneities and spatial scales – *Limnology and Oceanography* 59: 68–78.



# Selectivity by planktivorous fish at different prey densities, heterogeneities, and spatial scales

Piotr Maszczyk and Z. Maciej Gliwicz \*

Department of Hydrobiology, University of Warsaw, Warsaw, Poland

## Abstract

Studies in artificially confined, small-scale experimental systems with a homogeneous prey distribution suggest that selectivity in planktivorous fish for more conspicuous and rewarding prey (such as adult *Daphnia* with eggs in the brood cavities) is stronger at high than at low prey population density. We examined whether prey selectivity is altered when fish are allowed to feed in larger scale systems and on more heterogeneously distributed prey. The experimental system was comprised of 1000 liter tanks (one, four, or eight), interconnected to allow free movement of roach (*Rutilus rutilus*, eight per tank), with different densities of *Daphnia* prey, distributed with varying levels of homogeneity. As reported previously, the selectivity of roach increased at higher *Daphnia* densities, but only in small-scale systems where prey distribution was homogeneous. However, the opposite was found in large-scale systems with heterogeneous prey distribution, i.e., greater selectivity at lower prey densities. The reversed slope of the selectivity-on-prey-density regression was linked to increased swimming speed at low prey density, where the fish, less constrained by the limited size of the experimental system, accelerate, possibly in an effort to compensate for low encounter rate and to more rapidly locate patches of prey. More selective feeding on scarce and patchy prey may result from the decreased relative visibility of smaller prey and from the increased capture costs due to the need to expend more energy for postcapture accelerations to regain a higher speed.

Size-selective feeding by planktivorous fish is believed to be the key factor in structuring zooplankton communities of lakes (Hrbacek 1962; Brooks and Dodson 1965) and oceans (Hassel et al. 1991), and its effects on zooplankton prey have been the subject of much research (reviewed by Hunter and Thomas 1974; Lazzaro 1987; Gerking 1994). Despite this, the true nature of this pattern of feeding is not fully appreciated because data have been acquired in the confinement of experimental systems, often small aquaria, with zooplankton prey in homogenous distribution. Moreover, selectivity can be observed at each of the subsequent events in the predation process, i.e., prey encounter, pursuit, attack, and retention (Holling 1966; O'Brien 1979). However, in the case of prey such as *Daphnia*, selectivity is restricted to the encounter and pursuit phases, being entirely the function of detection and predator choice, with—in contrast to the situation with copepods—little chance of evasion or escape from the mouth of the predator (Gerking 1994). When a foraging fish actively chooses one prey item from among multiple prey after detecting it within its visual field volume, this selectivity may be an effect of either the different mechanistic accessibility of separate prey categories (O'Brien et al. 1976; Mills et al. 1986; Fiksen and MacKenzie 2002) or the different accessibility of each category combined with the predator's preference (Werner and Hall 1974). The first scenario has been readily adapted in theoretical works, since it offers a simple way to explain the effect of selectivity as a function of reaction distance alone (O'Brien et al. 1976; Wright and O'Brien 1984) or in combination with the speed of a foraging fish (Eggers 1977; Luo et al. 1996). The second scenario has primarily been used in experimental tests of the concept of optimal foraging (Emlen 1966; MacArthur and Pianka 1966; Schoener 1971)

by assuming that a foraging fish chooses a single prey, among the many encountered, to maximize energetic benefits (Werner and Hall 1974). Although both of these scenarios predict stronger selectivity toward larger or more conspicuous prey items (e.g., *Daphnia* females with eggs in their brood cavities), the majority of studies demonstrate that selectivity is greater than would be expected from differences in prey accessibility alone (Gardner 1981; Bence and Murdoch 1986; Manatunge and Asaeda 1999).

The two scenarios, each based on size-selective models of prey selectivity in fish, predict stronger selectivity at higher prey densities due to the enhanced probability of encountering a prey that is either easier to detect (O'Brien et al. 1976) or more profitable (Werner and Hall 1974). However, neither scenario takes into account the possibility that the selectivity could be affected by the swimming speed of a foraging fish, the greater speed resulting from the need to compensate for the reduced encounter rate at low prey densities, as suggested by Hunter and Thomas (1974), Munk and Kiørboe (1985), and Ruzicka and Gallager (2006). The acceleration may either cause a decline in the relative visibility of smaller or more transparent prey (Gendron and Staddon 1983) or make the cost of obtaining prey greater in the “fast mode” as a result of the energy expended for deceleration during the capture (Ware 1978) and for the postcapture acceleration (Domenici and Blake 1997), hence making slowing down for a small-bodied prey unprofitable (Kramer and McLaughlin 2001). Separately, each of these two effects may result in greater than expected selectivity of foraging fish at low prey density. Moreover, the underestimation of selectivity at low prey density can be even greater when prey is randomly distributed, as is often assumed in theoretical studies on prey-density-dependent selectivity (e.g., optimal foraging model, Werner and Hall 1974; apparent size model, O'Brien et al. 1976; reactive field

\* Corresponding author: z.m.gliwicz@uw.edu.pl

volume model, Eggers 1977; spatial foraging model, Luo et al. 1996). Such an underestimation may stem from the even greater swimming speed of fish in sites with a low density of heterogeneously distributed prey, not only to compensate for the reduced number of prey encountered, but also to more rapidly locate a more prey-profitable site.

The hypothesis that selectivity becomes stronger and diet breadth narrower at higher prey densities has been confirmed by landmark experimental studies (Werner and Hall 1974; Croy and Hughes 1991; Munk 1995) and limnological textbooks (Lampert and Sommer 2007). This notion is often considered the key to understanding the nature of foraging behavior in planktivorous fish such as predator-harvesters (Munk 1995), as well as the effects of selective foraging by fish on the structure of a typical prey population (Gliwicz et al. 2010). However, there are two reasons why this notion—despite its multiple experimental verifications—does not necessarily apply to genuine field situations. The prey-density-dependent selectivity models and their experimental testing have all been based on spatially small experimental systems in which the mobility of foraging fish is restricted, thus preventing them from achieving a sufficient speed to effectively search for a site with more abundant prey (e.g., 30 or 45 liters in experiments of MacKenzie and Kjørboe 1995 and Gliwicz et al. 2010, respectively). Even when performed in relatively large 450 liter tanks (Werner and Hall 1974) or 172 liter aquaria (Munk 1995), the experimental fish were offered homogeneously distributed prey (Werner and Hall 1974; Gibson 1980; Munk 1995). Moreover, in the few experiments performed with patchily distributed prey, the focus was on other aspects of feeding (competition or predation risk), rather than selectivity itself (Milinski and Heller 1978; Milinski 1979; Croy and Hughes 1991). The only exception, so far, is a recent study by Gliwicz et al. (2013) performed in a large-scale (8000 liter) experimental system with heterogeneously distributed prey, but its focus was on the adaptive value of aggregating behavior in *Daphnia* prey rather than on selectivity of roach (*Rutilus rutilus*) as its predator.

Prey-density-dependent selectivity has also been examined in the field by comparing the relative abundance of various zooplankton species or different size categories of a single species in the intestines of freshly netted fish, with zooplankton samples collected at the same time in the seining area. Such comparisons have shown that selectivity for larger, more visible, and more rewarding prey is stronger when the zooplankton prey are more abundant (Mittelbach 1981; Eggers 1982; Magnhagen 1985), thus confirming the results of theoretical and laboratory studies. However, such temporal changes in prey-density-dependent selectivity by planktivorous fish do not necessarily prove that the same should be expected for spatial changes in prey abundance across a lake or a sea bay, the study of which would be rather difficult because the intestinal contents of a freshly netted fish give no information on where or at what prey density the examined fish has been feeding. The situation is further complicated by the high unpredictability and instability of zooplankton prey distribution as well as the high mobility of fish, and this could be the reason why interest in optimal foraging and the mechanisms of prey

selection by fish declined after its peak between the 1970s and 1990s.

The ability to verify spatial prey-density-dependent selectivity in the field requires an experimental system that fulfills two conditions: first, it should be closer to the typical field situation in terms of both its spatial dimensions and the heterogeneity of prey distribution, and second, it must allow free movement of foraging fish among persistent patchily distributed prey. Such a system, using different densities of prey in various combinations of tanks that are interconnected to allow free movement of foraging fish between them, has been employed in this study.

Our aim was to test whether specific predictions that stem from the existing theory on optimal foraging (Emlen 1966; MacArthur and Pianka 1966; Schoener 1971), as well as earlier observations on feeding behavior in planktivorous fish (Croy and Hughes 1991; Munk 1995; Gliwicz et al. 2013), could be confirmed by experimental studies on fish allowed to feed in systems of different sizes and different levels of heterogeneity of zooplankton prey distribution.

The first prediction is that in a spatially small system with homogenous prey distribution, the selectivity of a foraging fish should increase (its optimal diet breadth being reduced) with the density of the prey population, when the encounter rate of the larger, more visible, and more rewarding prey category is high enough to ignore smaller prey. In this scenario, the subsequent large-bodied prey appears within the fish's visual field volume even before the previous prey has been handled and ingested. At lower densities of prey, the interval between the moment of successful ingestion and the appearance of the next large-bodied prey in the visual field volume might be too long to keep ignoring smaller prey that are usually more abundant and hence more frequently encountered.

The second prediction is that the tendency of the selectivity of a foraging fish for the larger prey category to increase with the density of the prey population should become weaker as the spatial scale of the system increases, i.e., the stronger selectivity for large-bodied prey at high than at low density of prey becomes offset by the stronger selectivity for large-bodied prey at low than at high prey density. The lack of confinement would allow fish to swim faster, with their swimming speed in the sites with scarce prey becoming high enough to make stopping for smaller prey maladaptive due to the costs of postcapture accelerations, as suggested by Gliwicz et al. (2013). For example, when feeding on a mixture of 2-d-old juveniles and 6-d-old adults of *Daphnia hyalina* with individual body carbon of 3.7 and 9.0  $\mu\text{g}$ , respectively, and the cost of a postcapture acceleration assumed to be 5  $\mu\text{g}$  carbon per capture regardless of prey body size, the juveniles should be ignored. This would make the selectivity for large-bodied prey equally high in areas of high and low prey population density.

The third prediction is that the tendency for the selectivity of a foraging fish for larger prey to increase with the density of the prey population should become reversed when a homogenous prey distribution in a spatially small system is replaced by a heterogeneous prey distribution in a spatially large system. Thus, the mechanism of prey-size selectivity based on optimal choice of prey

size in sites with abundant prey becomes overcome by a mechanism based on optimal decisions on whether or not to stop for a prey of different value when patrolling vast areas with scarce prey at great speed, where the gain from ingesting smaller prey is less than the investment necessary for postcapture acceleration. Rapidly regaining speed is essential to locate rare sites with more abundant prey before it has been annihilated by smarter and quicker fish (Gliwicz et al. 2013).

Each of these three predictions was tested using experimental data collected for a typical planktivorous fish (*R. rutilus*) as the predator with *Daphnia* as its typical prey, whose vulnerability is usually entirely a function of detection and predator choice. The effect of confinement was studied in experimental systems of different scale (a single tank, and in four or eight interconnected 1000 liter tanks with homogeneously distributed *Daphnia* prey), and the effect of prey patchiness was examined in the systems with interconnected tanks with different levels of heterogeneity in the distribution of the *Daphnia* prey.

## Methods

**The approach**—A large experimental data set was collected in the years 2007–2009 in an effort to test whether aggregating may be used as an antipredation defense in *Daphnia* in spite of the strong numerical response of fish in space (Gliwicz et al. 2013). This study was performed in experimental systems composed of four or eight 1000 liter tanks, interconnected into a loop to allow free movement of fish (1-yr-old roach, *R. rutilus*) to forage on known densities of *D. hyalina* prey for periods of between 2 and 12 h. These data have been supplemented by two unpublished sets of data, the first with the same roach feeding on the same clone of *D. hyalina* in the same tanks, but used as single, independent 1000 liter experimental compartments (2009), the second with the same roach feeding in the multitank systems on different *Daphnia* prey, namely, *Daphnia magna*, and *Daphnia cucullata*, of larger and smaller body size at first reproduction, respectively (2007), with data collected at the beginning of the experiments to identify the most convenient prey for a study on optimal foraging and food selectivity in a typical planktivorous fish.

From a total number of 211 feeding sessions completed in the years 2007–2009, the 118 sessions selected for the present study were those that fulfilled two conditions: that the fish were allowed to forage overnight for 12 h, and that quantitative data were available on the densities of juvenile and adult *Daphnia* prey before and after the feeding session. This number comprised three series of sessions: those carried out in eight tanks separated one from another (32 sessions in 2009), and those carried out in the system of tanks interconnected in groups of four (37 sessions in 2008–2009), or in groups of eight (24 sessions with *D. hyalina*, 13 with *D. cucullata*, and 12 with *D. magna* in 2007). Detailed information on the sessions performed with *D. hyalina*, including each session's number in the previous paper (Gliwicz et al. 2013), initial prey densities, mortalities, and recovery rates (each for two different initial density levels), is presented in the Web Appendix, Table A2 ([www.aslo.org/lo/toc/vol\\_59/issue\\_1/0068a.html](http://www.aslo.org/lo/toc/vol_59/issue_1/0068a.html)).

Detailed information on the sessions with *D. magna* and *D. cucullata* is presented in the Web Appendix, Table A1 (also for two different initial density levels).

All feeding sessions took place in a greenhouse with mosquito-netting walls and a semitransparent roof at the Hydrobiological Station in Pilchy, Poland (Gliwicz et al. 2013). For each session, eight fish were introduced into each of the tanks. Their number remained constant in the single-tank feeding sessions (2009), but fluctuated greatly in each tank of the multitank (four or eight) systems due to the high mobility of fish between tanks. Fish movement between tanks was via round windows of 18 cm in diameter (upper edge positioned 20 cm below the water surface), which allowed unconstrained cruising but prevented water currents that might homogenize the distribution of *Daphnia* prey during the feeding session (the windows were closed in the daytime when the fish were returned to their daytime refuges). All tanks were filled with filtered (Millipore 1  $\mu$ m mesh) water from the epilimnion of Lake Roś (Great Mazurian Lakes, Poland).

Each of the 2009 feeding sessions was from one of four 1-d experiments with different numbers of *Daphnia* prey introduced into each of the eight tanks, each treated as a separate system (Web Appendix, Table A2). The 2007–2009 multitank sessions were performed as a part of multiday experiments, each commencing with the mass introduction of *Daphnia* to the single “high-density” tank, with the remaining three (2008–2009) or seven (2007) “low-density” tanks in each system receiving small numbers of *Daphnia* prey. The initial densities of *Daphnia* prey resulted from dividing the maximum number of animals taken from the mass-culture tanks into one large portion of 88.1–92.2% for the high-density tank in the four- and the eight-tank systems, and into three or seven smaller portions of at least 4.0% or 1.1% each for the remaining three or seven low-density tanks, respectively. The density of *Daphnia* prey at the start of each experiment depended on the total number of *Daphnia* available. However, the initial densities for each of the subsequent feeding sessions in multiday experiments were dependent on the outcome of the preceding session, being the result of recruitment combined with mortality in each individual tank of either the single- or the multiple-tank systems. In the subsequent overnight feeding sessions, the differences in prey density between the high- and the low-density tanks were slightly reduced due to the persistently greater effect of fish in the high-density tanks resulting from the strong numerical response of fish in space (Gliwicz et al. 2013).

Although the data were collected in different seasons of separate years, efforts were made to ensure that for each spatial scale and each prey heterogeneity level examined, the experimental parameters remained constant, i.e., the number and size of the fish and their *Daphnia* prey (*D. hyalina*), the light conditions during each feeding session, and the dimensions of the experimental tanks. In addition, the mean water temperature range in each experimental variant was similar, remarkably so for the three different prey heterogeneity levels (18.6°C, 18.8°C, and 18.6°C), and only slightly different for the three spatial scales (19.2°C,



17.7°C, and 19.3°C; see Table 1). This was necessary to eliminate the possibility that any differences between the three scales and the three heterogeneity variants were caused by any interyear variation.

The effect of confinement was examined by comparing the results of feeding sessions carried out in three different tank systems representing three different spatial scales: one, four, or eight tanks with homogeneously distributed *Daphnia* prey among tanks, i.e., the difference in initial *Daphnia* density between tanks not exceeding three individuals (ind.) per liter. The analyzed data were obtained from 32, 13, and 5 feeding sessions performed in the single-, four-, and eight-tank systems, respectively (Table 1, Web Appendix, Table A2).

The effect of prey heterogeneity level was examined in 61 sessions performed in the four-tank (37) and the eight-tank (24) systems. The level of *Daphnia* prey spatial heterogeneity was assumed to be high when the difference between the tank with the highest density and the remaining three or seven tanks (mean values for these remaining tanks) was  $> 15$  *Daphnia* L<sup>-1</sup>, medium when the difference was 3–15 *Daphnia* L<sup>-1</sup>, and low when the difference was  $< 3$  *Daphnia* L<sup>-1</sup>. These ranges for the three heterogeneity categories gave a similar number of data points, the maximum and minimum densities in the high- and low-density tanks being 48 and 0.04 *Daphnia* L<sup>-1</sup>, respectively.

**Experimental animals**—At least 2 months before the start of the first feeding session of every year, 1+ yr-old roach (length 50–75 mm) were collected from Lake Roś (Mazurian Lakes, Poland), using a standard trawl net. The fish were acclimated in 500 liter holding tanks, and then groups of eight were maintained in separate daytime refuges: 60 liter containers filled with aerated lake water that was changed twice a week. The roach in these refuges were fed daily by the addition of 100–150 frozen *Chironomidae* larvae. The prey animals, represented by three different *Daphnia* species (*D. hyalina* clone HG011 from Lake Świącajtę, Mazurian Lakes; *D. cucullata* clone C014 from Lake Roś; and *D. magna* clone DM001 from an artificial temporary pond at Pole Mokotowskie, Warsaw, Poland) were cultured to densities below half the carrying capacity level in additional 1000 liter tanks and fed daily with the green alga *Scenedesmus obliquus* at a concentration above the incipient food level of 1 mg C L<sup>-1</sup> (Gliwicz and Maszczyk 2007). The fish and *Daphnia* cultures were maintained in water from the epilimnion of Lake Roś that had been filtered through a 1 µm Millipore membrane filter.

**Experimental design**—Each feeding session of every series was started 2 h before sunset, in similar light conditions. The initial illumination inside the tanks 0.1 m beneath the surface was between 1 and 10 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Before each feeding session, the fish were gently transferred from their daytime refuges to the 1000 liter tanks—each group of eight fish from one refuge added to one tank. Next, a submersible infrared video camera was placed into either every second tank in each single-tank feeding session (2009) or into each of the two most widely separated tanks in each multitank feeding session (2007–2009), one with the

high initial density and another with the low initial density of *Daphnia* prey. In each feeding session analyzed in this study, foraging by the roach was terminated after 12 h (2–3 h after sunrise) by transferring them back to their daytime refuges. Following the removal of fish from the multitank systems, the number of roach was adjusted to eight per daytime refuge tank by random manual transfer.

*Daphnia* samples were collected from each tank just before and after each feeding session. The water in each tank was mixed with a perforated Secchi disk and a sample taken immediately using a quantitative plankton net (six vertical hauls to sample *Daphnia* from 30 liters) and preserved in formalin–sugar solution. The *Daphnia* were enumerated, measured under a dissecting microscope, and assigned to three categories: juveniles, adults without eggs, or adults with eggs. In an attempt to amplify the data bank for selectivity-index computation, the samples from the low-density tanks in the eight-tank system (seven tanks) and the four-tank system (three tanks) were pooled into one sample comprising those from both the eight- and four-tank systems. Juveniles included all individuals of body size below, and adults, all those above, the size of the smallest gravid female for each of the three species (Fig. 1). The rate of *Daphnia* recovery was assessed as the expected percentage population density increase due to the recruitment of juveniles in the course of the 12 h feeding session in relation to the initial population density (*Daphnia* per liter). The recruitment was calculated as the number of eggs per liter (the sum of the eggs in brood cavities of all ovigerous females per liter in the sample taken before the start of the feeding session), divided by the temperature-dependent egg developmental time taken from Bottrell et al. (1976).

In an effort to compare the strength of roach selectivity for more rewarding adults when feeding on *Daphnia* of different body sizes, the mean selectivity index was derived from all feeding sessions with *D. cucullata* (13) and *D. magna* (12), and from 13 feeding sessions for *D. hyalina* (with data from the low-density tanks and the high-density tank) randomly selected from the 24 sessions available for this species from the same period of August to October 2007. The number of *D. hyalina* sessions was restricted in order to examine equal numbers of sessions for each of the three species in each heterogeneity-level category for the interspecies comparisons. Mean body length values were obtained from measurements of 338, 712, and 659 *Daphnia* used in the first three sequential feeding sessions performed with *D. cucullata*, *D. magna*, and *D. hyalina*, respectively.

Selectivity was assessed using Ivlev's (1961) selectivity index modified by Jacobs (1974) according to the equation  $D_i = (r - p)/(r + p - 2rp)$ , where  $r$  stands for the proportion of a given category ( $i$ ) among consumed *Daphnia* (estimated from the difference between samples taken before and after each feeding session) and  $p$  is the proportion of each category in samples taken from the tank before each feeding session. The Jacobs' index was used in the subsequent feeding sessions, since it is less sensitive than that of Ivlev to the relative proportion of the prey categories in the medium (Lampert and Sommer 2007). The selectivity was estimated either from the single samples taken before and after the feeding session in the one-tank

Table 1. Summary of the results of the 93 overnight feeding sessions of roach on *Daphnia hyalina* in three spatially different experimental systems (single tanks, or four or eight interconnected tanks) and at three different prey heterogeneity levels ( $< 3$ ,  $3\text{--}15$ , and  $> 15$  *Daphnia*  $\text{L}^{-1}$  in multitank systems), the data collected in 2009, 2008–2009, and 2007, respectively. The range of heterogeneity in *Daphnia* distribution is shown as the difference in *Daphnia* density between the high- and the low-density tanks. Other data presented are the water temperature, the number of sessions used in assessments of the effects of spatial scale and heterogeneity on selectivity by fish, the fish selectivity index (Jacobs 1974) for adults without eggs and those with eggs in their brood cavities when feeding at low and at high density of *Daphnia* prey, the recovery of the *Daphnia* population (as expected percentage of population density increase due to the recruitment of juveniles in the course of the 12 h feeding session in relation to the initial population density), and the speed of fish foraging in the high- and low-*Daphnia*-density tanks.

Parameters	One tank	Four tanks			Eight tanks		
	Jul 2009	Jul 2008–Jul 2009			Aug 2007–Sep 2007		
		$<3$ ind. $\text{L}^{-1}$	$3\text{--}15$ ind. $\text{L}^{-1}$	$>15$ ind. $\text{L}^{-1}$	$<3$ ind. $\text{L}^{-1}$	$3\text{--}15$ ind. $\text{L}^{-1}$	$>15$ ind. $\text{L}^{-1}$
Temp. mean $\pm 1$ standard deviation ( $^{\circ}\text{C}$ )	$19.2 \pm 0.56$	$19.3 \pm 1.67$	$19.9 \pm 1.19$	$19.8 \pm 1.31$	$16.9 \pm 4.29$	$18.1 \pm 2.97$	$15.4 \pm 3.13$
No. of feeding sessions in assessments							
Spatial scale effect	32	13	0	0	5	0	0
Heterogeneity effect	0	13	8	16	5	13	6
Mean selectivity index for adults							
Without eggs							
Low prey density	0.02*	0.14	0.37	0.29	0.25	0.29	0.37
High prey density	0.05*	0.08	0.23	0.03	0.11	0.07	−0.11
With eggs							
Low prey density	−0.01*	0.14	0.46	0.26	0.29	0.24	0.53
High prey density	0.10*	0.17	0.07	0.08	0.16	0.00	−0.06
Mean <i>Daphnia</i> recovery (% population density per 12 h)	6.4	6.9	5.0	9.9	6.0	9.4	4.6
Mean speed of fish ( $\text{cm s}^{-1}$ )							
Low prey density	18.9*	22.2	28.3	22.4	28.9	27.2	26.5
High prey density	16.5*	29.6	12.9	15.0	23.0	26.8	10.4

\* Exceptionally,  $< 3$  ind.  $\text{L}^{-1}$  at low-density tank and  $> 3$  ind.  $\text{L}^{-1}$  at high-density tank.

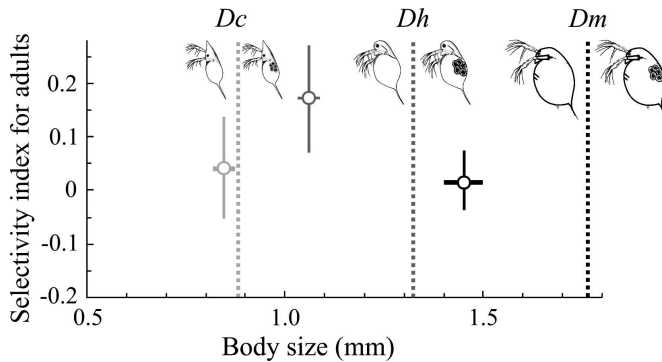


Fig. 1. Roach selectivity (Jacobs' index) for adult *Daphnia* with eggs (means shown by circles, with lines indicating standard error), of three species of different body size: *D. cucullata* (Dc, light gray), *D. hyalina* (Dh, dark gray), and *D. magna* (Dm, black). Dotted lines show species-specific size at first reproduction, assumed to be equal to the body size of the smallest female with eggs in the brood chamber in samples taken directly before the start of a feeding session.

system or separately for the tank with the highest *Daphnia* density and for the three or seven remaining tanks in the four- and eight-tank systems, respectively (pooled data on *Daphnia* densities from samples taken from each of the remaining tanks). Three assumptions were necessary in order to calculate the selectivity index: (1) predation was the exclusive cause of state-dependent mortality in each *Daphnia* age category, (2) the number of juveniles recruited to the population was equal to the number of juveniles attaining maturity in a given low- or high-density tank, and (3) the change in *Daphnia* abundance was due to mortality and not movement between the tanks.

The speed of fish movement was estimated in 16 (out of 37) single-tank feeding sessions (8+ measurements during the first 60 min of the feeding session), 18 (out of 38) in the four-tank, and 13 (out of 24) in the eight-tank feeding sessions (eight to ten measurements in the tank with the lowest and with the highest prey density in each multitank system) from video recordings stored on digital video disk. This was achieved by examining two freeze frames of a moving fish and measuring the distance traveled against a centimeter scale on the tank's bottom, then dividing this by the time elapsed between the two images.

## Results

The data accumulated from all fish feeding sessions with *D. cucullata* and *D. magna* as the prey, as well as from the 13 sessions with *D. hyalina* (performed in the same period; details in Web Appendix, Table A1), revealed greater selectivity (Jacobs' selectivity index) for adults without or with eggs ( $F_{1,50-52} \geq 6.61$ ,  $p \leq 0.0133$ , one-way ANOVA with Bonferroni's adjustment for three comparisons) in *D. hyalina* than in either *D. cucullata* and *D. magna*, but no such difference was found in either *D. cucullata* or *D. magna* (Fig. 1). This indicated that the middle-sized *D. hyalina* was the most convenient experimental prey, with fish showing the greatest selectivity difference between juveniles and adults of this species.

Although no controls were run to examine *Daphnia* density changes in the absence of fish, an earlier study based on the first data set obtained with the four- and eight-tank systems (fig. 2 in Gliwicz et al. 2013) showed that the effect of selective feeding on *Daphnia* ovigerous females was strongest at the beginning of each feeding session. Therefore, the 12 h recovery of the *Daphnia* population was likely to be lower than that calculated from the initial number of eggs in *Daphnia* brood cavities (Table 1) and well below 10% of the population density, hence well within the sampling error range (10–15%) for the density estimates.

Comparison of slopes of regressions for the relationship between selectivity and log-transformed prey density in each of the three spatial scales (i.e., one-, four-, and eight-tank feeding sessions; Fig. 2A,B) revealed a significant difference only between eight-tank and single-tank sessions for adult *D. hyalina* with eggs (analysis of covariance [ANCOVA], Table 2). Moreover, the elevations (intercepts) of the regression lines were different for the comparison between eight-tank and single-tank sessions for adults without eggs, as well as between four-tank and single-tank sessions, but only for adults with eggs (Table 2). The lack of a difference between four- and eight-tank sessions in both the slopes and the elevations indicated that data from these trials could be combined to examine the effects of heterogeneity of prey distribution on fish selectivity.

Regression analysis of the data combined from all four- and eight-tank feeding sessions (those from the high- and low-density tanks) for the selectivity at different log-transformed densities of *Daphnia* prey for the data plotted from all three heterogeneity levels showed greater selectivity at lower prey density for both the adults without and those with eggs ( $F_{1,122} = 13.4$ ,  $p < 0.0004$  and  $F_{1,122} = 20.6$ ,  $p < 0.0001$ , respectively; Fig. 2C,D). The same regression analysis for each heterogeneity level showed greater selectivity at lower prey density, but only for medium and high heterogeneity levels for both adults without and those with eggs ( $F_{1,42} > 7.6$ ,  $p < 0.0089$  and  $F_{1,42} > 11.9$ ,  $p < 0.0013$ , respectively). Such a difference in selectivity according to the prey density level could not be detected in the data from single-tank sessions ( $n = 32$ , not shown in Fig. 2C,D).

Comparison of regressions for selectivity on log-transformed prey density for the three different prey heterogeneity ranges (small,  $< 3$ ; medium,  $3-15$ ; and large,  $> 15$  ind.  $L^{-1}$ ) revealed a significant difference between the sessions with small and large heterogeneity and between those with small and medium heterogeneity for both adults without and those with eggs, when the identity of their slopes was tested. However, there was no significant difference between sessions with medium and large heterogeneity, in either their slopes or elevations (Table 2; Fig. 2C,D).

The mean fish speed for the first 60 min of each feeding session was found to be much lower in the one-tank system ( $17.0 \pm 4.9$  cm  $s^{-1}$ ,  $n = 16$ ) than in the four- or eight-tank systems, where it was  $27.7 \pm 8.9$  ( $n = 8$ ; four for each high- and low-density tank) and  $26.9 \pm 8.1$  cm  $s^{-1}$  ( $n = 6$ ; three for the high-density tank and the other tanks), respectively. This was a possible effect of eliminating heterogeneity by restricting estimates to the sessions where the between-tank difference in density did not exceed three *Daphnia* per liter.

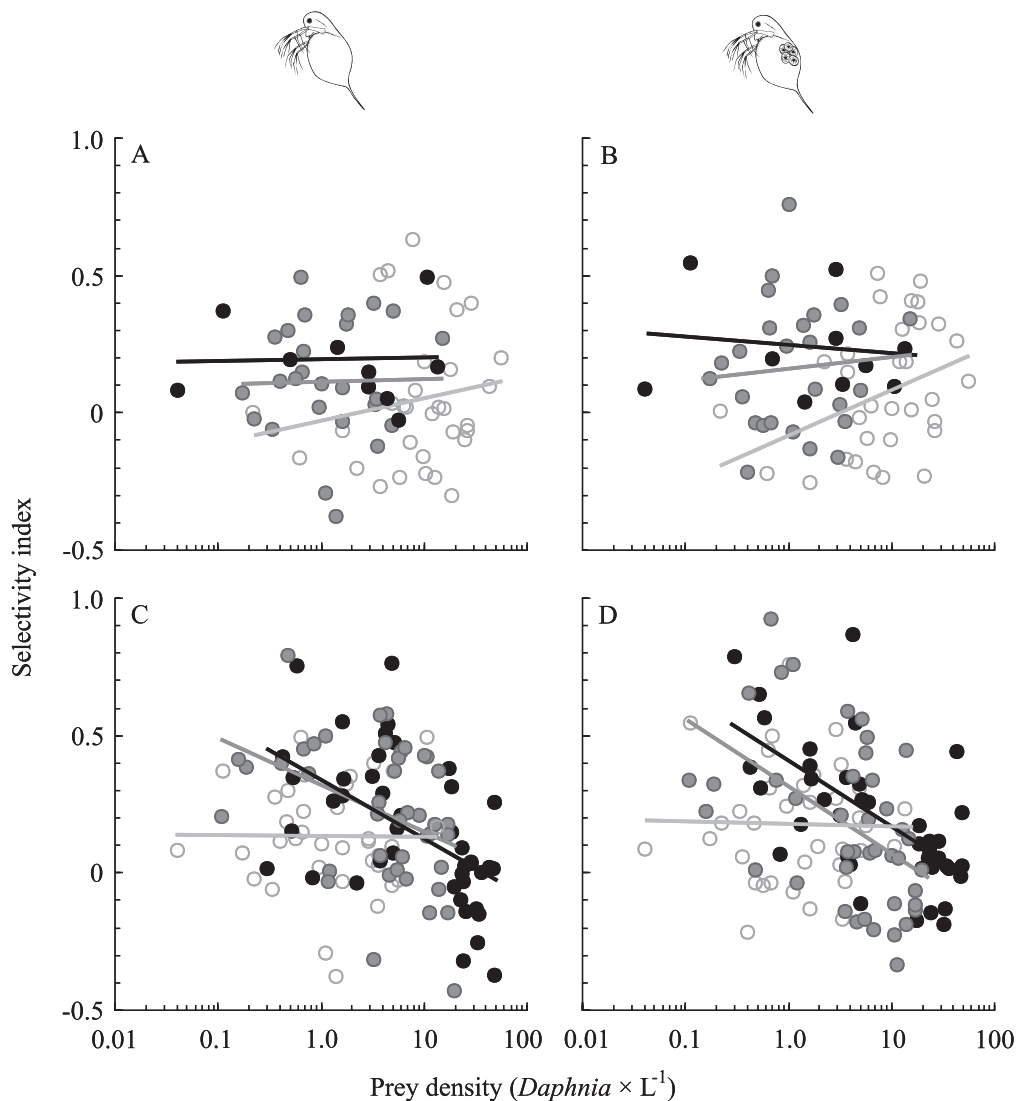


Fig. 2. Fish selectivity (Jacobs' index) for adult *D. hyalina*, (A, C) without and (B, D) with eggs in feeding sessions starting at different initial prey densities, performed (A, B) at three spatial scales (single tank, or four or eight interconnected tanks: light gray, dark gray, and black circles and regression lines, respectively), or (C, D) at different prey heterogeneity levels in the four- or eight-tank systems (shown as the difference in prey density between the tanks with the highest and lowest *Daphnia* densities: < 3, 3–15, and > 15 ind.  $L^{-1}$ ; light gray, dark gray, and black triangles and regression lines, respectively). The effect of spatial scale was examined in 32 one-tank overnight feeding sessions performed in 2009 and in 5 and 13 sessions with eight and four interconnected tanks performed in 2007 and 2008–2009, respectively. The selectivity was estimated for one prey density in each of the single-tank sessions, and for two densities in each of the four- or eight-tank sessions: that from the tank with the highest *Daphnia* density and that from the three or seven remaining tanks (with samples pooled to produce a single value), with the difference between the tank with the highest density and the other tanks never exceeding three *Daphnia* per liter. The same procedure was used to examine the effect of heterogeneity level in 61 feeding sessions performed in the four-tank (37 sessions) and the eight-tank (24 sessions) systems in 2007–2009, to produce selectivity data from 122 points ( $n = 61 \times 2$ ).

In spite of the wide variability of the data, the fish speed was found to decline with an increase in log-transformed density of *Daphnia* prey, when the data for both high- and low-density tanks were plotted for all 31 multitank sessions (out of 61) in which speed was assessed (ANCOVA,  $p < 0.0001$ ,  $F_{1,62} = 24.8$ ).

Regression analysis of the fish speed on log-transformed prey density revealed a negative correlation in each of the one-, four-, and eight-tank sessions (16, 4, and 3, respectively, each from the high-density tank and the mean of the remaining three or seven tanks in each of the

multitank sessions,  $n = 16, 8$ , and  $6$ , respectively;  $F_{1,6} = 8.49$ ,  $p = 0.0435$ ; Fig. 3A). However, no significant differences were found in any comparison of one-, four-, and eight-tank sessions when the identity of their slopes was tested (Fig. 3A; the difference in density between the tank with the lowest and that with the highest prey density not exceeding 3 ind.  $L^{-1}$  in each of the second- and third-series sessions). Comparison of the regressions revealed significant differences between the one- and four-, as well as the one- and eight-tank sessions, when the identity of their elevations was tested ( $F > 7.25$ ,  $p < 0.0136$ ; Fig. 3A).



Table 2. Influence of the spatial scale of the experimental system and the heterogeneity of prey distribution on selectivity-on-prey-density regressions for roach tested (in each of the two combinations) by ANCOVA ( $F$ ,  $p$ , degrees of freedom [df]). The number of tanks in the experimental system was one tank (2009), or four or eight interconnected tanks (2008–2009 and 2007, respectively). The heterogeneity of prey distribution in the four- and eight-tank sessions is expressed as the difference in prey density between the tank with the highest and the tank with the lowest density of *Daphnia* prey in the system ( $N_{\text{Highest}} - N_{\text{Lowest}}$ ). Regressions are evaluated for *Daphnia* adults without eggs and adults with eggs, with no difference in slopes or elevations (intercepts) detected in juveniles. Statistical significance (in bold) accepted after Bonferroni's adjustment for three comparisons at  $p < 0.0167^*$ ,  $p < 0.0017^{**}$ . ns indicates nonsignificance.

Parameters compared	Combinations	Adults without eggs						Adults with eggs					
		Slopes			Elevations			Slopes			Elevations		
		$F$	$p$	df	$F$	$p$	df	$F$	$p$	df	$F$	$p$	df
Scale (number of tanks)	1 and 4	0.38	ns	1.55	2.07	ns	1.56	0.66	ns	1.55	<b>7.03</b>	*	<b>1.56</b>
	1 and 8	0.31	ns	1.38	<b>6.94</b>	*	<b>1.39</b>	<b>5.53</b>	*	<b>1.38</b>	7.89	*	1.39
	4 and 8	0.01	ns	1.29	0.97	ns	1.30	0.20	ns	1.29	0.68	ns	1.30
Heterogeneity (ind. $L^{-1}$ )	<3 and 3–15	<b>6.78</b>	*	<b>1.74</b>	6.14	*	1.75	<b>6.98</b>	*	<b>1.74</b>	1.02	ns	1.75
	<3 and >15	<b>7.71</b>	*	<b>1.76</b>	5.68	*	1.77	<b>10.96</b>	**	<b>1.76</b>	6.47	*	1.77
	3–15 and >15	0.31	ns	1.82	0.05	ns	1.83	0.31	ns	1.82	0.05	ns	1.83

Regression analysis of the selectivity of adult *D. hyalina* (those without and with eggs) at different log-transformed fish speeds in the tank with the lowest and the tank with the highest prey density in each of the 31 feeding sessions performed in the four- or eight-interconnected tank systems revealed a positive correlation between speed and selectivity of fish ( $F_{1,62} = 8.95$ ,  $p = 0.0040$ ; Fig. 3B). However, ANCOVA testing for differences in the selectivity on fish speed regressions between each of three combinations of the three ranges of heterogeneity in prey distribution did not show any significant difference in their slopes or elevations for adults without or with eggs.

## Discussion

The results of this study support each of the three predictions on size selectivity of planktivorous fish at different zooplankton prey densities. First, they reveal that the selectivity of a foraging fish, confined to a small volume of water with homogenous prey distribution, increases with the density of the prey population due to selection of the most conspicuous and most valuable prey class where prey is more abundant. This finding is exactly as predicted by classical theory on optimal foraging and as anticipated from the results of numerous earlier experiments in which fish confined to a small water volume were allowed to feed on zooplankton prey that was mixed well to reduce the scatter of data. Second, the results show that the tendency of the selectivity of a foraging fish for larger prey to increase with the density of the prey disappears in larger volume experimental systems when the stronger selectivity for large-bodied prey at high prey density is offset by the stronger selectivity for large-bodied prey at low prey density. This occurs when the greater space allows foraging fish to swim faster until their swimming speed becomes sufficiently high to make stopping for smaller prey maladaptive due to the high costs of postcapture accelerations. Thus, the effects of the two mechanisms of prey-size selection make the selectivity for large-bodied prey equally strong in habitats with high and low prey population

densities. Third, the results of this study also reveal that the tendency of the selectivity of a foraging fish for larger prey to increase with the density of the prey population becomes reversed when a homogenous prey distribution in a spatially small system is replaced by a heterogeneous prey distribution in a spatially large system. In this case, the mechanism of prey-size selectivity based on optimal choice of prey size becomes overcome by another mechanism based on the decision of whether or not to stop for prey of different value. Smaller prey may represent a gain that is less than the investment required to support the postcapture acceleration needed to regain a higher speed that, in habitats of large spatial scale with a patchy prey distribution, is necessary to continue seeking sites with more abundant prey.

Each of the three predictions was confirmed by the analysis of data from experiments with young European roach, a typical size-selective predator–harvester, and a medium-sized cladoceran, *Daphnia hyalina*, that has been used as a prey in many earlier studies with roach (Gliwicz and Wrzosek 2008; Maszczyk and Bartosiewicz 2012), including experiments on prey-size selectivity (Gliwicz et al. 2010, 2012, 2013). The choice of this prey species was based on the findings of preliminary experiments that demonstrated strong positive size selectivity in young roach for egg-carrying females of *D. hyalina*, as compared with weak selectivity for smaller adults of *D. cucullata* (possibly too small a difference in net gain between juveniles and adults) and negligible selectivity for large-bodied adults of *D. magna*, which could stem from the gape limitation of young roach. While the relative difference in visibility between juveniles and adults seems to be similar for each of the three *Daphnia* species, the stronger selectivity for adults of *D. hyalina* (Fig. 1) implies that the active selection of energetically more rewarding prey individuals should be most profitable when a predator is feeding on medium-sized prey. This hypothesis has yet to be supported by any data, but it seems expedient to match the body size of experimental prey to the size of the predator and its judgment that the net reward from consuming juveniles and adults is significantly different.



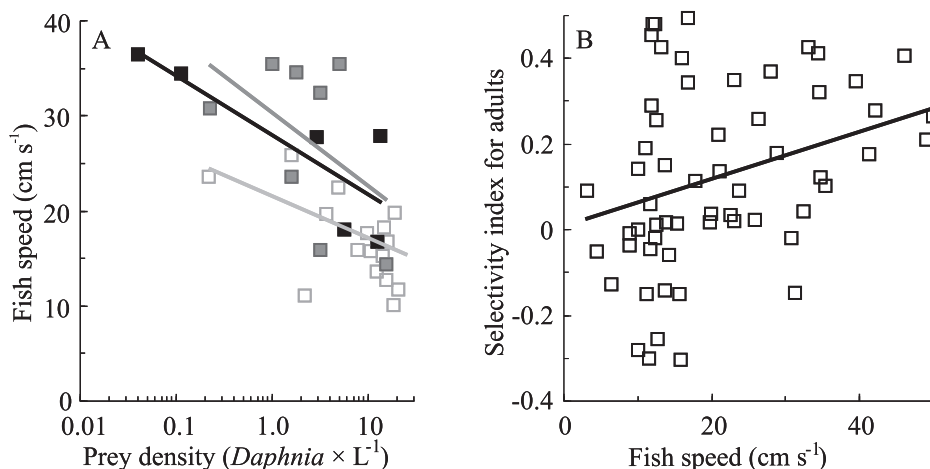


Fig. 3. Relationships between prey density or fish selectivity and fish speed obtained from video recordings. (A) Speed of fish movement on prey density regressions for feeding sessions in one-, four-, and eight-tank systems (light gray, dark gray, and black squares and regression lines;  $n = 16, 8$ , and  $6$ , respectively) performed in 2009, 2008–2009, and 2007, respectively, with the difference between densities in the high-density tank and the mean from the remaining tanks in multitank sessions never exceeding three *Daphnia* per liter. (B) Fish selectivity (Jacobs' index) for *D. hyalina* adults (those without and with eggs) on fish speed (cm s<sup>-1</sup>) regressions for data collected during the first 60 min of each feeding session from the tanks with the highest and lowest prey densities; sessions performed in eight- and four-tank systems in 2007 and 2008–2009, respectively (31 out of 61 sessions), shown as the means (squares for  $n = 62$ ) with a regression line.

Although the data collected during the single-tank feeding sessions support the notion of stronger selectivity at high than low prey density, this phenomenon was not observed when fish were allowed to move freely between interconnected tanks (four or eight) containing homogeneously distributed prey. The difference in selectivity between the single- and multitank experimental systems declined with prey density level. This was the result of increased selectivity at low rather than reduced selectivity at high prey density and was associated with fish swimming speed being higher in the more spacious and complex systems of interconnected tanks than in the single-tank system. A higher speed of foraging in a larger enclosure has also been observed in other planktivorous fishes, e.g., the brook trout *Salvelinus fontinalis* (Tang and Boisclair 1993). This higher speed could be the reason for greater prey selectivity due to either reduced visual acuity (Gendron and Staddon 1983) or the increased energetic costs of decelerations and postcapture accelerations, or both, each being more significant at increased velocity (Kramer and McLaughlin 2001; Gliwicz et al. 2013). The former could stem from the relatively lower visibility of juveniles, while the latter might call for a decision based on the relative profitability of capturing a juvenile vs. an adult. The speed of foraging roach in the single-tank experiments was comparable with that measured in small experimental systems in earlier studies, such as that carried out in 100 liter mesocosms by Linlokken et al. (2010). Moreover, in the interconnected tanks, the speeds were much greater than those recorded previously. This corroborates our hypothesis that the apparent density-dependent selectivity observed in earlier studies was due to the effects of confinement, which were stronger in smaller than in larger volume experimental

systems. The apparent increase in the swimming speed of the fish as the spatial scale of the experimental system expanded was probably due to the accessibility of more space in which to forage. The fish, released from the confinement of a small and simple experimental system, increased their cruising speed in the quest for more proficient feeding sites, an observation which could be considered a typical “wall effect”: one of the six categories of scale-dependent behavioral constraints listed by Englund and Cooper (2003).

With the increase in spatial scale (from a single tank to the systems of four and eight interconnected tanks) and with greater heterogeneity in prey distribution, the selectivity for adult *Daphnia*, particularly those with eggs, was apparently greater in sites with a low rather than a high density of prey. Therefore, it could be argued that the heterogeneity of prey distribution does affect selectivity, but only in a site where the prey density is low and when the prospects of finding patches at other sites are good (as can be observed in Fig. 2C,D). Such a scenario may result from the higher speed of a foraging fish in sites with a low density of prey. This would not only compensate for the low encounter rate resulting from the low prey density, but it would also make locating a patch quicker.

The increased speed of foraging fish when the prey density is low is consistent with the notion that fish adjust their feeding behavior, particularly their swimming speed, to the availability of prey (Munk and Kiørboe 1985; Munk 1995; Ruzicka and Gallagher 2006). This might be expected to be common in predator–harvesters, such as planktivorous fish, that move fast and have to pay a high cost for the capture of each prey item that is not much lower than the gain. However, the results of the present study are clearly contradictory to those of previous theoretical and experi-

mental studies in terms of the direction of density-dependent selectivity. Werner and Hall (1974) ignored the importance of wall effects in limiting the freedom of a foraging fish to swim faster when prey is less abundant, particularly when its distribution is heterogeneous. Therefore, this contradiction might stem from the presence or absence of this effect in experimental systems of different spatial scale. Furthermore, it may be speculated that the evident acceleration in sites with a low prey density, when the zooplankton prey distribution is heterogeneous, may result from the memorized presence of a patch at another site. Such learning may possibly be of greater importance for the direction of change in prey-density-dependent selectivity than the lower probability of encountering a more conspicuous and rewarding prey.

The results of the present study are in accordance with the claim that the majority of planktivorous fishes exhibit a saltatory foraging strategy (i.e., intermittent locomotion, Kramer and McLaughlin 2001), with acceleration when relocating without foraging. In this case “swimming bursts” are interrupted by short pauses when the fish is scanning for prey or its own predator (O’Brien et al. 1990; Bartoń and Hovestadt 2013). This behavior has been observed in both juveniles and adults (Kleerekoper et al. 1970; MacKenzie and Kiørboe 1995). In spite of the high costs of a precapture deceleration and postcapture acceleration, saltatory foraging seems to be the most efficient strategy in terms of energetic advantage (Videler and Weihs 1982; Kramer and McLaughlin 2001). A foraging fish should expend less energy when alternating between rest and movement than when moving continuously at an intermediate speed (Anderson et al. 1997). Whereas deceleration at high prey densities improves visual acuity (Gendron and Staddon 1983) and increases the chance of remaining longer in a site of high prey density (Hunter and Thomas 1974), acceleration at low prey densities allows patches to be located more rapidly (Gliwicz et al. 2013).

In conclusion, the greater selectivity of a foraging fish in the presence of a high density of prey observed in earlier studies (Werner and Hall 1974; Croy and Hughes 1991) could be at least partially attributed to the effects of its confinement and the homogeneity of its prey. In such experimental systems, the walls do not allow a foraging fish to swim with appropriate speed through the artificial habitat, and the fish has no motivation to search for an alternate site with more abundant prey. The results of the present study suggest that the gradual change from the typical laboratory world of homogeneity and confinement to the open and diverse reality of a lake or an ocean is accompanied by an increase in the complexity of fish foraging behavior, with different patterns of optimal foraging applied in locations with abundant and scarce zooplankton prey.

#### Acknowledgments

We thank A. Hankiewicz for assistance with the experimental work and D. Wrzosek, J. Uchmański, J. R. Gittins, M. Czarnocka-Cieciura, and M. Bartosiewicz for comments on the earlier draft of this manuscript. Special thanks are given to the two anonymous reviewers for their ingenious suggestions. The

research described here was supported by Polish State Committee for Scientific Research grants, particularly N N304 067336 to P.M. and 2P04G01430 to Z.M.G., as well as grant 2011/03/B/NZ8/02093 from the Polish National Science Center and a grant from the Foundation for Polish Science to Z.M.G.

#### References

- ANDERSON, J. P., D. W. STEPHENS, AND S. R. DUNBAR. 1997. Saltatory search: A theoretical analysis. *Behav. Ecol.* **8**: 307–317, doi:10.1093/beheco/8.3.307
- BARTOŃ, K. A., AND T. HOVESTADT. 2013. Prey density, value, and spatial distribution affect the efficiency of area-concentrated search. *J. Theor. Biol.* **316**: 61–69, doi:10.1016/j.jtbi.2012.09.002
- BENCE, J. R., AND W. W. MURDOCH. 1986. Prey size selection by the mosquitofish: Relation to optimal diet theory. *Ecology* **67**: 324–336, doi:10.2307/1938576
- BOTTRELL, H. H., A. DUNCAN, Z. M. GLIWICZ, E. GRYGIEREK, A. HERZIG, A. HILLBRICHT-LKOWSKA, A. KURASAWA, P. LARSSON, AND T. WEGLEŃSKA. 1976. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norw. J. Zool.* **24**: 419–456.
- BROOKS, J. L., AND S. I. DODSON. 1965. Predation, body size, and composition of plankton. *Science* **150**: 28–35, doi:10.1126/science.150.3692.28
- CROY, M. I., AND R. N. HUGHES. 1991. Effects of food supply, hunger, danger and competition on choice of foraging location by the fifteen-spined stickleback, *Spinachia spinachia* L. *Anim. Behav.* **42**: 131–139, doi:10.1016/S0003-3472(05)80613-X
- DOMENICI, P., AND R. W. BLAKE. 1997. The kinematics and performance of fish fast-start swimming. *J. Exp. Biol.* **200**: 1165–1178.
- EGGERS, D. M. 1977. The nature of prey selection by planktivorous fish. *Ecology* **58**: 46–59, doi:10.2307/1935107
- . 1982. Planktivore preference by prey size. *Ecology* **63**: 381–390, doi:10.2307/1938956
- EMLÉN, J. M. 1966. The role of time and energy in food preference. *Am. Nat.* **100**: 611–617, doi:10.1086/282455
- ENGLUND, G., AND S. D. COOPER. 2003. Scale effects and extrapolation in ecological experiments. *Adv. Ecol. Res.* **33**: 161–213, doi:10.1016/S0065-2504(03)33011-9
- FIKSEN, Ø., AND B. R. MACKENZIE. 2002. Process-based models of feeding and prey selection in larval fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **243**: 151–164, doi:10.3354/meps243151
- GARDNER, M. B. 1981. Mechanisms of size selectivity by planktivorous fish: A test of hypotheses. *Ecology* **62**: 571–578, doi:10.2307/1937723
- GENDRON, R. P., AND J. E. R. STADDON. 1983. Searching for cryptic prey: The effect of search rate. *Am. Nat.* **121**: 172–186, doi:10.1086/284049
- GERKING, S. D. 1994. *Feeding ecology of fish*. Academic Press.
- GIBSON, R. M. 1980. Optimal prey-size selection by threespine sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*): a test of the apparent size hypothesis. *Zeit. Tier.* **52**: 291–307.
- GLIWICZ, Z. M., AND P. MASZCZYK. 2007. *Daphnia* growth hindered by chemical information on predation risk at low and high food levels. *Oecologia* **150**: 706–715, doi:10.1007/s00442-006-0528-7
- , J. JABIOŃSKI, AND D. WRZOSEK. 2013. Patch exploitation by planktivorous fish and the concept of aggregation as an antipredation defense in zooplankton. *Limnol. Oceanogr.* **58**: 1621–1639, doi:10.4319/lo.2013.58.5.1621
- , AND W. USZKO. 2012. Enhanced growth at low population density in *Daphnia*: The absence of crowding effects or relief from visual predation? *Freshwater Biol.* **57**: 1166–1179, doi:10.1111/j.1365-2427.2012.02783.x

- , E. SZYMAŃSKA, AND D. WRZOSEK. 2010. Body size distribution in *Daphnia* populations as an effect of prey selectivity by planktivorous fish. *Hydrobiologia* **643**: 5–19, doi:10.1007/s10750-010-0125-y
- , AND D. WRZOSEK. 2008. Predation-mediated coexistence of large- and small-bodied *Daphnia* at different food levels. *Am. Nat.* **172**: 358–374, doi:10.1086/589890
- HASSEL, A., H. SKJOLDAL, H. GJØSÆTER, AND L. OMLI. 1991. Impact of grazing from capelin (*Mallotus villosus*) on zooplankton: A case study in the northern Barents Sea in August 1985. *Polar Res.* **10**: 371–388, doi:10.1111/j.1751-8369.1991.tb00660.x
- HOLLING, C. S. 1966. The functional response of invertebrate predator to prey density. *Mem. Entomol. Soc. Can.* **48**: 1–85, doi:10.4039/entm9848fv
- HRBACEK, J. 1962. Species composition and the amount of the zooplankton in relation to the fish stock. *Rozp. Cesk. Akad. Ved, Rada Mat. Prir. Ved* **72**: 1–116.
- HUNTER, J. R., AND G. L. THOMAS. 1974. Effect of prey distribution and density on the searching and feeding behavior of larval anchovy *Engraulis mordax* Girard, p. 559–574. In J. H. S. Blaxter [ed.], *The early life history of fish*. Springer-Verlag.
- IVLEV, V. S. 1961. *Experimental ecology of the feeding of fishes*. Yale Univ. Press.
- JACOBS, J. 1974. Quantitative measurements of food selection: A modification of the forage ratio and Ivlev's selectivity index. *Oecologia* **14**: 413–417, doi:10.1007/BF00384581
- KLEEREKOPER, H., A. M. TIMMS, G. F. WESTLAKE, F. B. DAVY, T. MALAR, AND V. M. ANDERSON. 1970. An analysis of locomotor behaviour of gold-fish (*Carassius auratus*). *Anim. Behav.* **18**: 317–330, doi:10.1016/S0003-3472(70)80044-6
- KRAMER, D. L., AND R. L. McLAUGHLIN. 2001. The behavioral ecology of intermittent locomotion. *Am. Zool.* **41**: 137–153, doi:10.1668/0003-1569(2001)041[0137:TBEOLJ]2.0.CO;2
- LAMPERT, W., AND U. SOMMER. 2007. *Limnology: The ecology of lakes and streams*, 2nd ed. Oxford Univ. Press.
- LAZZARO, X. 1987. A review of planktivorous fishes: Their evolution, feeding behaviours, selectivities and impacts. *Hydrobiologia* **146**: 97–167, doi:10.1007/BF00008764
- LINLOKKEN, A. N., E. BERGMAN, AND L. GREENBERG. 2010. Effect of temperature and roach *Rutilus rutilus* group size on swimming speed and prey capture rate of perch *Perca fluviatilis* and *R. rutilus*. *J. Fish Biol.* **76**: 900–912, doi:10.1111/j.1095-8649.2010.02545.x
- LUO, J., S. B. BRANDT, AND M. J. KLEBASCO. 1996. Virtual reality of planktivores: A fish's perspective of prey size selection. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **140**: 271–283, doi:10.3354/meps140271
- MACARTHUR, R. H., AND E. R. PIANKA. 1966. On the optimal use of a patchy environment. *Am. Nat.* **100**: 603–609, doi:10.1086/282454
- MACKENZIE, B. R., AND T. KJØRBOE. 1995. Encounter rates and swimming behaviour of pause travel and cruise larval fish predators in calm and turbulent environments. *Limnol. Oceanogr.* **40**: 1278–1289, doi:10.4319/lo.1995.40.7.1278
- MAGNHAGEN, C. 1985. Random prey capture or active choice? An experimental study on prey size selection in three marine fish species. *Oikos* **45**: 206–216, doi:10.2307/3565707
- MANATUNGE, J., AND T. ASAEDA. 1999. Optimal foraging as the criteria of prey selection by two centrarchid fishes. *Hydrobiologia* **391**: 223–240.
- MASZCZYK, P., AND M. BARTOSIEWICZ. 2012. Threat or treat: The role of fish exudates in the growth and life history of *Daphnia*. *Ecosphere* **3**: 91, doi:10.1890/ES12-00146.1
- MILINSKI, M. 1979. An evolutionary stable feeding strategy in sticklebacks. *Z. Tierpsychol.* **51**: 36–40, doi:10.1111/j.1439-0310.1979.tb00669.x
- , AND R. HELLER. 1978. Influence of a predator on the optimal foraging behaviour of sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Nature* **275**: 642–644, doi:10.1038/275642a0
- MILLS, E. L., J. L. CONFER, AND D. W. KRETCHMER. 1986. Zooplankton selection by young yellow perch: The influence of light, prey density, and predator size. *Trans. Am. Fish. Soc.* **115**: 716–725, doi:10.1577/1548-8659(1986)115<716:ZSBYP>2.0.CO;2
- MITTELBACH, G. G. 1981. Foraging efficiency and body size: A study of optimal diet and habitat use by bluegills. *Ecology* **62**: 1370–1386, doi:10.2307/1937300
- MUNK, P. 1995. Foraging behaviour of larval cod (*Gadus morhua*) influenced by prey density and hunger. *Mar. Biol.* **122**: 205–212.
- , AND T. KJØRBOE. 1985. Feeding behavior and swimming activity of larval herring *Clupea harengus* in relation to density of copepod nauplii. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **24**: 15–21, doi:10.3354/meps024015
- O'BRIEN, W. J. 1979. The predator-prey interaction of planktivorous fish and zooplankton. *Am. Sci.* **67**: 572–581.
- , H. I. BROWMAN, AND B. I. EVANS. 1990. Search strategies of foraging animals. *Am. Sci.* **78**: 152–160.
- , N. A. SLADE, AND G. L. VINYARD. 1976. Apparent size as the determinant of prey selection by bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Ecology* **57**: 1304–1310, doi:10.2307/1935055
- RUZICKA, J. J., AND S. M. GALLAGER. 2006. The saltatory search behavior of larval cod (*Gadus morhua*). *Deep-Sea Res II* **53**: 2735–2757, doi:10.1016/j.dsr2.2006.09.003
- SCHOENER, T. W. 1971. Theory of feeding strategies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **2**: 369–404, doi:10.1146/annurev.es.02.110171.002101
- TANG, M., AND D. BOISCLAIR. 1993. Influence of the size of enclosures on the swimming characteristics of juvenile brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 1786–1793, doi:10.1139/f93-200
- VIDELER, J. J., AND D. WEIHS. 1982. Energetic advantages of burst-and-coast swimming of fish at high speeds. *J. Exp. Biol.* **97**: 169–178.
- WARE, D. M. 1978. Bioenergetics of pelagic fish: Theoretical change in swimming speed and ration with body size. *J. Fish. Res. Board Can.* **35**: 220–228, doi:10.1139/f78-036
- WERNER, E., AND D. J. HALL. 1974. Optimal foraging and the size selection of prey by the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Ecology* **55**: 1042–1052, doi:10.2307/1940354
- WRIGHT, D. I., AND W. J. O'BRIEN. 1984. The development and field test of a tactical model of the planktivorous feeding white crappie (*Pomoxis annularis*). *Ecol. Monogr.* **54**: 65–98, doi:10.2307/1942456

Associate editor: Thomas Kjørboe

Received: 23 February 2013

Accepted: 03 September 2013

Amended: 18 September 2013

## **VI.9. Załącznik 9**

Maszczyk P., Bartosiewicz M., Jurkowski J.E., Wyszomirski T. 2014 – Interference competition in a planktivorous fish (*Rutilus rutilus*) at different prey densities and temperatures – Limnology 15: 155–162.

# Interference competition in a planktivorous fish (*Rutilus rutilus*) at different prey densities and temperatures

Piotr Maszczyk · Maciej Bartosiewicz ·  
Jakub Eryk Jurkowski · Tomasz Wyszomirski

Received: 10 May 2013 / Accepted: 27 January 2014 / Published online: 19 February 2014  
© The Author(s) 2014. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** The effect of interference competition can be assessed by comparing the capture rate of a predator foraging alone with that of the predator within a group. Since such an effect could be prey density dependent, a constant density of prey must be maintained while assessing this effect, irrespective of the elimination of prey by predation. However, when studying a predator-harvester, such as a planktivorous fish, which collects zooplankton at a rate of up to 1 prey  $s^{-1}$ , instantaneous replacement of each consumed prey item is not feasible. This problem was solved in short-lasting mesocosm experiments by minute-by-minute supplementation to replace eliminated *Daphnia* and maintain a constant average prey density. Such experiments were performed with different numbers of foraging roach (*Rutilus rutilus*) at three prey densities and in two

ranges of ambient temperature. The number of *Daphnia* required at the start of each experiment to establish the initial prey density and the number that it was necessary to add per minute were determined in experiments conducted without prey supplementation and in preliminary experiments with prey supplementation. The results of this study revealed that fish foraging in a group eat less, due to both exploitation and non-aggressive competition for space. Moreover, the effect of interference competition was stronger at higher temperatures, irrespective of the prey density, indicating that natural populations of roach foraging in shoals may suffer more from competitive interactions in warmer waters.

**Keywords** Density dependence · Intraspecific competition · Interference competition · Feeding rate

Handling Editor: Christopher Steiner.

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10201-014-0426-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

P. Maszczyk (✉) · M. Bartosiewicz · J. E. Jurkowski  
Department of Hydrobiology, Faculty of Biology, Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw, Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warsaw, Poland  
e-mail: p.maszczyk@uw.edu.pl

**Present Address:**  
M. Bartosiewicz  
Institut National de la recherche scientifique, Centre Eau, Terre et Environnement, Quebec, Canada

T. Wyszomirski  
Department of Plant Ecology and Environmental Conservation, Faculty of Biology, Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw, Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warsaw, Poland

## Introduction

Interference competition occurs when direct interactions between resource-sharing competitors (congeners or conspecifics) reduce access to shared resources, leading to a decrease in the rate of utilization of those resources (Miller 1967; Hassell and Varley 1969). This decrease could be due to active (e.g., Mansour and Lipcius 1991; Cresswell 1997) or passive (e.g., Dolman 1995) interactions, the former manifested through food theft and aggressive interactions, and the latter through obstruction of access to resources to other individuals by non-aggressive behavior. In the competition for food, the effect of interference might be obscured by a reduction in the feeding rate due to food depletion (exploitative competition) by competitors. As such an effect is difficult to exclude in experiments, little effort has been made to accurately assess the quantitative



impact of interference on the feeding rates, growth, and survival rates of competing animals, despite evidence of their importance (Schoener 1983). While most studies facing this problem have focused on demonstrating the simultaneous effect of both types of competition (e.g., MacIsaac and Gilbert 1991; Rutten et al. 2010), surprisingly, some have implicitly assumed that the effect of exploitation is negligible (e.g., Sutherland and Koene 1982; Ens and Goss-Custard 1984; Stillman et al. 2002; Nakayama and Fuiman 2010; Ping et al. 2011). However, it is clear that exploitative competition may lead to a gross overestimation of the effect of interference, since the latter phenomenon is prey density dependent (Sutherland and Koene 1982; Vahl et al. 2005).

The majority of studies that have attempted to test the effect of interference alone have approached the issue indirectly using either statistical (Scharf et al. 2008) or mathematical (Stillman et al. 2000) tools, including models based on field observations (Gyimesi et al. 2010), or a complex description of diet versus space use with measurements of both prey availability and risk of intraspecific interactions (Post et al. 1999). A simple direct measurement of the level of interference competition can only be achieved in a few specific systems where competition is coupled with the excretion of allelochemicals: toxins or growth inhibitors (Steinwascher 1978; Folt and Goldman 1981). In such systems, to distinguish the effects of both types of competition, the experiments must be performed at the same prey density but in the presence of different concentrations of chemicals from congeners or conspecifics. Otherwise, it is necessary to employ more complex direct experimental designs in order to ensure a constant resource level (Anholt 1990; Peckarsky 1991; Smallegange et al. 2006). To our knowledge, this strategy has only been applied to examine the effect of active interference in competitors foraging for large prey, where it is relatively easy to monitor their behavior and to maintain a stable prey density by immediately replacing each prey item eaten (“immediate consumption” approach). In comparison, there is a dearth of experimental studies examining the effect of passive interference between predator-harvesters, such as planktivorous fishes, which collect planktonic prey at the rate of 1 item every few seconds (Bartosiewicz and Gliwicz 2011).

Despite recent efforts to quantify the effects of interference (Gyimesi et al. 2010; Nakayama and Fuiman 2010; Rutten et al. 2010; Ping et al. 2011), little is known about how these effects are influenced by external factors that may be biotic (e.g., prey density) or abiotic (e.g., environmental temperature). Most previous studies—either theoretical (Stillman et al. 2000) or empirical (Sih 1981; Dolman 1995; Cresswell 1998; Triplet et al. 1999)—support the notion that interference is stronger at lower prey

densities (or reduced encounter rates). This may be the result of either a prolonged search time during which interference can happen (Ruxton et al. 1992; Moody and Ruxton 1996) or the occurrence of an additional kind of interference that is profitable only when prey is sparse (e.g., kleptoparasitism in Stillman et al. 2002; aggression in Sale 1972). Since none of the aforementioned studies attempted to exclude the effect of exploitation, the impact of prey density on the effects of interference is yet to be fully investigated.

In ectotherms, the metabolic rate increases (exponentially) with temperature, leading to a greater energetic demand per individual that has to be compensated for by increasing assimilation (Aarssen 1983). A higher temperature enhances the ability of a predator to search for prey, due to (1) increased speed of movement (Persson 1986), (2) more effective prey-capture kinematics (Wintzer and Motta 2004), and (3) reduced handling time, which allows more time for searching (Thompson 1978). Greater foraging motivation and better searching ability may result in a higher encounter rate with the prey (Dreisig 1981), as well as an increased frequency of encounters with congeners or conspecifics (Kruse et al. 2008). The former may lead to higher capture rates, while the latter intensifies interference competition.

The importance of temperature in competitive interactions between foraging fish has mainly been studied in terms of the spatial or temporal separation of the fish, due to the different thermal optima of separate species (Baltz et al. 1982) or size classes within a single species (Beitinger and Magnuson 1975). Although the studies cited above have identified mechanisms that are responsible for stronger interactions at higher temperatures (usually increased aggressive behavior), the possible effects of other temperature-dependent components, such as exploitative competition, have generally been ignored. Consequently, the quantitative impact of interference remains unknown, because the effect of interference competition has not been separated from those of other possible factors. Despite the common belief that ambient temperature is crucial in determining the outcome of competitive interactions within a group of fish, and the abundance of literature on the temperature-dependent effects of competition in fish species from marine (Biro et al. 2010), riverine (Baltz et al. 1982; McMahon et al. 2007), and lacustrine (Beitinger and Magnuson 1975; Krause et al. 1998) environments, we are unaware of any study that has tested for such competitive interactions. Persson (1982, 1986) showed that the feeding activity of a common planktivorous fish (roach, *Rutilus rutilus*) increased with ambient temperature, and he suggested that this could alter the outcome of passive interference between individuals, but his claims lack experimental corroboration.

The aim of this study was to assess the impact of passive interference competition on the prey capture rate of planktivorous fish by excluding the effect of exploitation competition. This was achieved by manipulation of the initial prey density and minute-by-minute addition of prey to maintain relatively constant average prey densities, irrespective of the number of foraging fish. This novel approach allowed us to determine whether, and to what extent, food concentration and temperature (the main factors controlling feeding rate and growth in fish; Wootton 1990) affect the strength of interference competition in roach.

## Materials and methods

The experiments were performed during the summer (August 2009) and autumn (October 2009) periods at the Hydrobiological Station in Pilch, Poland, within a field enclosure with mosquito netting walls and a transparent roof (Gliwicz et al. 2013). This setup ensured semi-natural conditions, including similar light intensities ( $1.7\text{--}3.8 \mu\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  30 min before dusk), with temperature being the only factor that differed significantly between the summer ( $19.4\text{--}20.2^\circ\text{C}$ ) and autumn ( $11.9\text{--}14.4^\circ\text{C}$ ) experiments. One-year-old ( $8 \pm 1$  cm) roach (*Rutilus rutilus*) used in the experiments were caught in Lake Roś (Mazurian Lakes, NE Poland) using a standard trawl net at least 1 month before the start of the first experiment in each period. Post-capture, the experimental fish were maintained in 1000-L steel holding tanks (50 per tank) and fed daily with a constant amount of *Daphnia* prey (5000–10,000 per tank). The prey (*Daphnia hyalina* clone HG011 obtained from Lake Świecajty, Poland) was propagated in 10-L aquaria at  $20^\circ\text{C}$  and fed daily with the green alga *Scenedesmus acutus* at a concentration above the incipient food level ( $1.0 \text{ mg C L}^{-1}$ ). The populations of both fish and prey were maintained in water from the epilimnion of Lake Roś that had been filtered through a  $1\text{-}\mu\text{m}$  Millipore membrane filter. The *Daphnia* densities used in each experiment were similar to those commonly found in natural lakes (Lampert and Sommer 2007), and the roach density ranges were similar to those reported for fish feeding in shoals (e.g., Eklöv and Persson 1995; Gliwicz et al. 2006).

Seven short-lasting (5.5 min) experiments were performed in each period (August and October 2009) in open-topped, non-transparent PVC tanks containing 60 L of water. Each experiment employed 12 treatments: 1, 5, 10, or 20 fish were allowed to harvest *Daphnia* at one of three different density levels. In the first two experiments of each period (experiments without supplementation:  $I_{\text{nsuppl}}$  and  $II_{\text{nsuppl}}$  in the Appendix), initial *Daphnia* density levels of

5, 10, or  $20 \text{ ind. L}^{-1}$  were established but not subsequently replenished, so their exploitation by foraging fish caused a gradual decrease in prey density. These experiments were performed to determine the cumulative effect of interference and exploitation. In the subsequent experiments (experiments with supplementation:  $I_{\text{suppl}}\text{--}V_{\text{suppl}}$  in the Appendix), the initial *Daphnia* densities were assessed and then maintained by minute-by-minute supplementation with numbers that were calculated to replace the eaten prey. Both the initial density and the supplement of *Daphnia* added each minute were specific to each treatment, and were determined (by trial and error) from the capture rate calculated from the two preceding experiments. The difference between the required and the real-time prey density (resulting from the difference between the rates of prey elimination and prey supplementation) increased over the course of each experiment due to the cumulative error, reaching its highest value at the end. Consequently, the difference between the mean (during the course of the experiment) and required (approximately 5, 10, or  $20 \text{ ind. L}^{-1}$ ) density was always lower than the difference between the final (after 5.5 min of foraging) and required density. It was assumed that a difference of 10 % between the required and final prey density is the threshold value below which the density could be considered stable and equal in treatments with the same required prey density level. This assumption was fulfilled only in the last three experiments of each period (main experiments:  $III_{\text{suppl}}\text{--}V_{\text{suppl}}$ ). Preliminary experiments with supplementation ( $I_{\text{suppl}}\text{--}II_{\text{suppl}}$ ) were excluded from the analysis.

Prior to the start of each experiment, the numbers of *Daphnia* required to establish the desired initial prey density in each treatment were placed in glass beakers containing 0.1 L of lake water. Another 60 beakers (5 for each treatment) containing 50 mL of filtered lake water only (experiments  $I_{\text{nsuppl}}\text{--}II_{\text{nsuppl}}$ ) or water containing *Daphnia* (experiments  $I_{\text{suppl}}\text{--}V_{\text{suppl}}$ ) were prepared, to be added at 1-min intervals during the experiment. The roach were netted from a holding tank, assigned to groups of the required size (1, 5, 10, or 20 fish), transferred into each experimental tank, and allowed sufficient time to acclimate to unconstrained foraging (based on previous experiments). The fish used in each experiment were netted at random from a group of  $\sim 400$  individuals housed in eight separate 1000-L holding tanks, so the probability that the same fish were used in subsequent experiments in the same treatment was very low.

Each experiment began with the addition of a low initial prey density ( $\sim 5 \text{ ind. L}^{-1}$ ) to the first four tanks containing the required numbers of fish. A digital stopwatch was used to measure elapsed time, and the beakers containing filtered lake water only (in experiments  $I_{\text{nsuppl}}\text{--}II_{\text{nsuppl}}$ ) or water with *Daphnia* (in experiments

$I_{\text{suppl}} - V_{\text{suppl}}$ ) were emptied into the respective tanks at 60-s intervals (after the 1st, 2nd, 3rd, 4th, and 5th minute). To ensure that the feeding fish did not suffer any external disturbance, prey additions were made via a plastic funnel connected to an angled glass tube passing through the wall of each tank and into the water. Continuous delicate bubble-induced mixing of the water was used to maintain a homogeneous distribution of prey items in the tanks. After 5.5 min of feeding, all fish were simultaneously removed from the tanks. This procedure was then repeated in 4 tanks with the intermediate ( $\sim 10$  ind.  $L^{-1}$ ) and finally with the high ( $\sim 20$  ind.  $L^{-1}$ ) density of *Daphnia* in such a way that the intervals between treatments were never longer than 5 min. After removing the fish from the experimental tanks, all remaining *Daphnia* from each tank were collected separately using a zooplankton net. The *Daphnia* were immediately preserved in formaldehyde and concentrated in separate 200-mL plastic containers for counting under a microscope.

In experiments  $I_{\text{nsuppl}} - II_{\text{nsuppl}}$ , the feeding rate of a fish ( $C_i$ ) in treatment  $i$  was calculated simply as  $C_i = (n_0 - n_t) \times N_i^{-1} \times \Delta t^{-1}$ , where  $n_0$  is the initial number of *Daphnia* (300, 600, or 1200 ind.),  $n_t$  the number of *Daphnia* remaining after the experiment,  $N_i$  the number of fish (1, 5, 10, or 20 ind.), and  $\Delta t$  the duration of the experiment (5.5 min). In experiments  $I_{\text{suppl}} - V_{\text{suppl}}$ , the initial prey density ( $n_{i0}$ ) was the sum of the required prey density assigned to each treatment ( $n_r$ ; i.e., 5, 10, or 20 *Daphnia*  $L^{-1}$ ) and the number of *Daphnia* equivalent to (and compensating for) the loss of prey items anticipated in the first 30 s of feeding ( $C_{ix} \times N_i \times 2V^{-1}$ ), where  $C_{ix}$  is the mean feeding rate in treatment  $i$ , as estimated from the two most recent previous experiments in the series,  $N_i$  the number of fish in treatment  $i$ , and  $V$  is the volume of water (60 L). Compensation for the anticipated reduction in prey abundance was achieved by the minute-by-minute addition of the calculated number of *Daphnia* ( $C_{ix} \times N_i$ ). The feeding rate of a fish ( $C_i$ ) in each treatment for experiments with supplementation  $i$  was calculated as  $C_i = (n_{i0} + n\Delta t - n_t) \times N_i^{-1} \times \Delta t^{-1}$ , where  $n\Delta t$  is the total number of *Daphnia* added each minute during the experiment.

The effects of the number of fish, *Daphnia* prey density, the presence or absence of prey supplementation each minute, and temperature on the capture rate of roach were tested in a general linear model, with the number of fish treated as a continuous variable and the other factors as categorical variables (SAS 9.4 procedure GLM; SAS Institute 2013). Due to interactions between fish number and both supplementation and temperature ( $N_f \times \text{Suppl}$  and  $N_f \times \text{Temp}$ ; Table 1; Fig. 1), four separate ANCOVAs (for the effects of *Daphnia* density, with  $N_f$  as a covariate)

**Table 1** General linear model tests of effects on the prey capture rate of roach, with number of fish ( $N_f$ ) employed as a continuous variable, and supplementation of prey at 1-min intervals (Suppl), temperature (Temp), and *Daphnia* prey density ( $D_p$ ) as categorical variables

Factor or interaction	Mean square	F	df	p
$N_f$	76.2	216.3	1	****
Suppl	0.0	0.0	1	NS
Temp	144.9	411.2	1	****
$D_p$	63.1	179.3	2	****
$N_f \times \text{Suppl}$	7.2	20.5	1	****
$N_f \times \text{Temp}$	17.3	49.0	1	****
$N_f \times D_p$	0.0	0.0	2	NS
$D_p \times \text{Suppl}$	1.2	3.3	2	*
$D_p \times \text{Temp}$	11.0	31.4	2	****
$\text{Suppl} \times \text{Temp}$	0.1	0.2	1	NS

Data from experiments without supplementation ( $I_{\text{nsuppl}} - II_{\text{nsuppl}}$ ) and the main experiments with prey supplementation ( $III_{\text{suppl}} - V_{\text{suppl}}$ )

(1) Error degrees of freedom = 96,  $R^2 = 0.956$ ; (2) of all the higher-order interactions (not shown), only one was significant ( $N_f \times \text{Suppl} \times \text{Temp}$ ,  $p = 0.03$ )

NS not significant

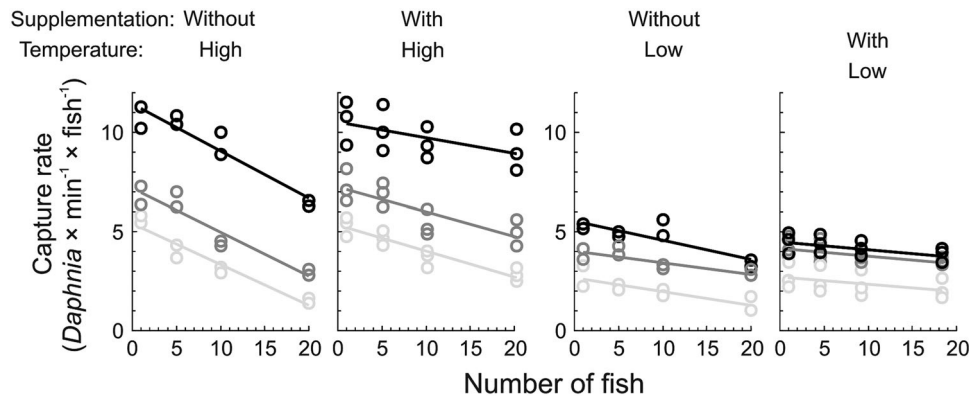
Statistical significance: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$

were performed for each combination of the two factors (SAS 9.4 procedure GLM; SAS Institute 2013). From these ANCOVAs, interval estimates were obtained for the effects of number of fish and *Daphnia* prey density, using Tukey's honest significant difference (HSD) method for unequal sample sizes, repeated for three standard significance levels (Table 2). The confidence level was set at 95 %, with the significance of each difference determined by comparing particular confidence limits (Cumming 2012).

## Results

Only the results from the two experiments without supplementation ( $I_{\text{nsuppl}} - II_{\text{nsuppl}}$  in the Appendix) and the last three experiments of each series with prey supplementation (main experiments,  $III_{\text{suppl}} - V_{\text{suppl}}$  in the Appendix) in each period (August and October) were included in the analysis. The difference between the initial and required mean prey density (i.e., 5, 10, or 20 *Daphnia*  $\times L^{-1}$ ) was maintained at less than  $\pm 9$  %, and the difference between the required final density (i.e., 5, 10, or 20 *Daphnia*  $\times L^{-1}$ ) and the obtained final prey density was kept below  $\pm 10$  % for all treatments only in experiments  $III_{\text{suppl}} - V_{\text{suppl}}$  (see the Appendix). In those experiments, the maximal number of *Daphnia* added to the tank each minute did not exceed 17 % of the required mean density in a given treatment; therefore, the relative variation in prey density also did not exceed 17 % in any treatment.





**Fig. 1** Capture rates of fish foraging in different group sizes (1, 5, 10, or 20 roach) at three prey density levels (5, 10 or 20 *Daphnia* L<sup>-1</sup>; gray, dark gray, and black circles, each as a single treatment and regression lines, respectively) in two experiments without

supplementation of prey (I<sub>nsuppl</sub>–II<sub>nsuppl</sub>) and in the main experiments with prey supplementation (III<sub>suppl</sub>–V<sub>suppl</sub>), and at high and low ambient temperature

**Table 2** Effects of the number of fish ( $N_f$ , effect quantified by the slope of the relationship) and *Daphnia* prey density ( $D_p$ , differences between means in 5, 10, and 20 ind. L<sup>-1</sup> treatments, denoted d5, d10, and d20, respectively) on the prey capture rate of roach in

experiments without supplementation (I<sub>nsuppl</sub>–II<sub>nsuppl</sub>) and the main experiments with prey supplementation (III<sub>suppl</sub>–V<sub>suppl</sub>), and at high and low temperatures

Suppl. Temp.	Without High	With High	Without Low	With Low
$N_f$ (slope)	-0.22 *** [-0.25, -0.19]	-0.12 *** [-0.15, -0.08]	-0.08 *** [-0.10, -0.05]	-0.04 * [-0.07, -0.02]
$D_p$ (d20–d10)	4.11 *** [3.42, 4.81]	3.79 *** [3.04, 4.53]	1.23 *** [0.68, 1.78]	0.38 NS [-0.12, 0.89]
$D_p$ (d10–d5)	1.64 *** [0.94, 2.34]	2.03 *** [1.29, 2.78]	1.53 *** [0.98, 2.08]	1.63 *** [1.13, 2.13]
$D_p$ (d20–d5)	5.75 *** [5.06, 6.45]	5.82 *** [5.07, 6.56]	2.76 *** [2.21, 3.31]	2.01 *** [1.51, 2.52]

The 95 % confidence intervals are given in parentheses

NS not significant

Statistical significance: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$

The per capita feeding rate, calculated as the number of prey consumed per minute, was significantly affected by the number of fish, temperature, and *Daphnia* prey density, while there was no evidence for an overall effect of supplementation (Table 1). Analysis revealed that the effect of fish number (1) differed between experiments without supplementation and the main experiments with supplementation (Table 1,  $N_f \times$  Suppl. interaction), (2) was affected by temperature (Table 1,  $N_f \times$  Temp interaction), but (3) showed no dependence on the density of *Daphnia* prey (Table 1, nonsignificant  $N_f \times D_p$  interaction). In further analyses performed separately for each supplementation  $\times$  temperature combination, interactions between fish number and *Daphnia* density were consistently nonsignificant. The per capita feeding rate decreased as the number of foraging fish increased (all slopes were significantly negative; Table 2), and it was reduced at lower *Daphnia* prey densities. The effect of interference (effect of the  $N_f$  in expts. III<sub>suppl</sub>–V<sub>suppl</sub>) was greater at higher temperature (according to a comparison of the respective confidence limits in Table 2). In particular, the differences in capture

rates between *Daphnia* densities were much more apparent at higher temperature (Table 2).

## Discussion

The experiments performed in this study were designed to separate the effect of exploitative competition from the effect of interference in a planktivorous fish (roach)–zooplankton (*Daphnia*) system, in order to determine whether the latter phenomenon causes a reduction in capture rate. To achieve this, a relatively stable prey density was maintained, regardless of the number of foraging fish in the experimental tanks, by supplementation to replace eliminated prey at constant and reasonably short intervals. The obtained data indicate that a typical planktivorous fish such as roach may suffer from reduced foraging efficiency, not only due to ongoing exploitation, but also as a result of direct interactions within the shoal. As it was not possible to quantify the effects of antagonistic interactions, the mechanisms underlying the competitive behavior

responsible for this reduction remain uncharacterized. Nevertheless, since antagonistic behavior is commonly regarded as rare or even absent in young roach (Haberlehner 1988), we speculate that this effect is not due to aggressive interactions. Conceivably, the most important mechanism involves passive interference, where individuals obstruct access to resources due to non-aggressive behavior, e.g., encounter avoidance.

The reduction in foraging efficiency could also be due (at least in part) to the time lag when multiple fish attempt to capture a single prey item and all but one are unsuccessful. However, this is likely to have been of minor importance in our experiments because, unlike in the “immediate consumption” approach, the visual field of each fish was continuously filled with tiny prey items. Conversely, two other effects of grouping may enhance foraging success (Davis and Olla 1992). First, there is a stronger urge to feed, since fish tend to capture the subsequent prey as fast as possible before it is taken by a nearby competitor (Pitcher et al. 1982). Second, there is the opportunity to invest more time in capturing prey, since the task of vigilance can be shared among group members (Roberts 1996; Bartosiewicz and Gliwicz 2011). Nevertheless, the decline in capture rate detected in fish in a larger group implies that overall deterioration of foraging conditions due to encounter avoidance and the increased probability of unsuccessful attack far outweighs any potential benefits of grouping in the conducted experiments.

The experimental method employed here is different from any used in previous studies, in which two kinds of competition were separated (Anholt 1990; Smallegange et al. 2006). Our novel approach was considered most suitable because the high capture rates of planktivorous fish feeding on zooplankton necessitated supplementation with high numbers of tiny *Daphnia* (up to 218 individuals every minute for the treatment with the highest prey and fish densities). This particular feature of the planktivorous fish–zooplankton interface prevented the use of the immediate consumption approach employed previously to test the effect of interference on fish feeding exclusively on relatively large food items such as cold-killed adult *Artemia salina* (Rangeley and Kramer 1998) or artificial food (Shaw et al. 1995). The specificity of the planktivorous fish–zooplankton interface made it possible to (1) conduct shorter experiments than those performed with less-voracious predators, e.g., damselfly larvae (Anholt 1990), and (2) use a prey supplementation method based on the provision of previously calculated prey numbers at 1-min intervals. In a previous study (Bartosiewicz and Gliwicz 2011), the instant replacement of each prey eaten proved challenging in the case of three simultaneously foraging fish consuming up to one prey per second, and so would not

be feasible for 10 or 20 foraging fish. The minute-by-minute supplementation of *Daphnia* did not preclude variations in their density from higher (just after a supplementation) to lower (just before the subsequent supplementation) than required, particularly in treatments with the highest fish density. Nevertheless, it is reasonable to assume that a decreased capture rate towards the end of each minute was compensated for by an increased capture rate at the start of the next minute, so that these effects canceled each other out.

The findings of this study support the notion that capture rates in planktivorous fish increase at higher prey densities (e.g., Eggers 1977; Gliwicz et al. 2013). The results did not reveal any difference in the strength of interference at different prey density levels, even though it might be expected that interference would be stronger at low prey densities when fish swim faster in an attempt to compensate for a lower prey encounter rate (Munk and Kiørboe 1985; Maszczyk and Gliwicz 2014). The effect of higher swimming speed could be even more pronounced in a spatially large-scale system with heterogeneously distributed prey, where fish are able to swim with appropriate speed. In this scenario, the increased speed of fish in a less profitable patch reflects the need to compensate for a low encounter rate and the need to rapidly locate a more profitable patch. However, in such a system, prey density dependent interference may be more affected by the presence of a larger number of fish within a more profitable patch due to their swift numerical response than by changes in swimming speed. If this is the case, then in systems where foraging is less spatially constrained and conditions are closer to the open and diverse reality of a lake, it is more likely that interference becomes stronger at high rather than low prey density. The results of this study also show that the foraging rate and the effect of interference competition are greater at higher temperature, thus leading to a need for supplementation with a greater number of prey and slightly larger fluctuations in the actual prey density within each 1-min interval during the experiments.

In conclusion, the results of this study indicate that the effect of interference competition on the feeding rates of planktivorous fish in groups of different sizes can be assessed when separated from that of exploitation through the maintenance of a stable prey density. Using such a methodological approach, we have demonstrated that the strength of interference competition may vary with environmental conditions.

**Acknowledgments** We thank Z.M. Gliwicz, J.R. Gittins, and B.D. Barst for their insightful comments that have improved the manuscript, P. Koperski for statistical support, as well as J. Dziarska-Palac, A. Hankiewicz, M. Kulik, and M. Nowicka for assistance during the experiments. This research was supported by a grant from the State Committee for Scientific Research, Poland (NN304 067336) to P.

Maszczyk, as well as grant 2011/03/B/NZ8/02093 from the Polish National Science Center to Z.M. Gliwicz. The final part of this study was carried out at the Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw, established within a project co-financed by the EU European Regional Development Fund under the Innovative Economy Operational Program, 2007–2013. All experiments comply with the current laws of the country in which they were performed.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

## References

- Aarssen LW (1983) Ecological combining ability and competitive combining ability in plants: toward a general evolutionary theory of coexistence in systems of competition. *Am Nat* 122:707–731
- Anholt BR (1990) An experimental separation of interference and exploitative competition in a larval damselfly. *Ecology* 71:1483–1493
- Baltz DM, Moyle PB, Knight NJ (1982) Competitive interactions between benthic stream fishes, riffle sculpin (*Cottus gulosus*) and speckled dace (*Rhinichthys osculus*). *Can J Fish Aquat Sci* 39:1502–1511
- Bartosiewicz M, Gliwicz ZM (2011) Temporary intermissions in capturing prey (*Daphnia*) by planktivorous fish (*Rutilus rutilus*): are they due to scramble competition or the need for antipredation vigilance? *Hydrobiologia* 668:125–136
- Beitinger TL, Magnuson JJ (1975) Influence of social rank and size on thermoselection behavior of bluegill (*Lepomis macrochirus*). *J Fish Res Board Can* 32:2133–2136
- Biro PA, Beckmann C, Stamps JA (2010) Small within-day increases in temperature affects boldness and alters personality in coral reef fish. *Proc R Soc Lond Biol* 277:71–77
- Cresswell W (1997) Interference competition at low competitor densities in blackbirds *Turdus merula*. *J Anim Ecol* 66:461–471
- Cresswell W (1998) Variation in the strength of interference competition with resource density in blackbirds, *Turdus merula*. *Oikos* 81:152–160
- Cumming G (2012) Understanding the new statistics. Routledge, New York
- Davis MW, Olla BL (1992) The role of visual cues in the facilitation of growth in a schooling fish. *Environ Biol Fishes* 34:421–424
- Dolman PM (1995) The intensity of interference varies with resource density: evidence from a field study with snow buntings *Plectrophenax nivalis*. *Oecologia* 102:511–514
- Dreisig H (1981) The rate of predation and its temperature dependence in a tiger beetle *Cicindela hybrids*. *Oikos* 36:196–202
- Eggers DM (1977) The nature of prey selection by planktivorous fish. *Ecology* 58:46–59
- Eklöv P, Persson L (1995) Species-specific antipredator capacities and prey refuges: interactions between piscivorous perch (*Perca fluviatilis*) and juvenile perch and roach (*Rutilus rutilus*). *Behav Ecol Sociobiol* 37:169–178
- Ens BJ, Goss-Custard JD (1984) Interference among oystercatchers, *Haematopus ostralegus*, feeding on mussels, *Mytilus edulis*, on the Exe estuary. *J Anim Ecol* 53:217–231
- Folt C, Goldman CR (1981) Allelopathy between zoo-plankton: a mechanism for interference competition. *Science* 213:1133–1135
- Gliwicz ZM, Slon J, Szynekarczyk I (2006) Trading safety for food: gut contents in roach and bleak captured at different distances offshore from their daytime littoral refuge. *Freshwat Biol* 51:823–839
- Gliwicz ZM, Maszczyk P, Jabłoński J, Wrzosek D (2013) Patch exploitation by planktivorous fish and the concept of aggregation as an antipredation defense in zooplankton. *Limnol Oceanogr* 58:1621–1639
- Gyimesi A, Stillman RA, Nolet BA (2010) Cryptic interference competition in swans foraging on cryptic prey. *Anim Behav* 80:791–797
- Haberlechner E (1988) Comparative analysis of feeding and schooling behaviour of the Cyprinidae *Alburnus alburnus* (L. 1758), *Rutilus rutilus* (L. 1758), and *Scardinius erythrophthalmus* (L. 1758) in a backwater of the Danube near Vienna. *Int Rev Hydrobiologia* 73:537–546
- Hassell MP, Varley GC (1969) New inductive population model for insect parasites and its bearing on biological control. *Nature* 223:1133–1136
- Krause J, Staaks G, Mehner T (1998) Habitat choice in shoal of roach as a function of water temperature and feeding rate. *J Fish Biol* 53:377–386
- Kruse PD, Toft S, Sunderland KD (2008) Temperature and prey capture: opposite relationships in two predator taxa. *Ecol Entomol* 33:305–312
- Lampert W, Sommer U (2007) Limnology: the ecology of lakes and streams, 2nd edn. Oxford University Press, New York, pp 234–277
- MacIsaac HJ, Gilbert JJ (1991) Discrimination between exploitative and interference competition between *Keratella cochlearis* and *Cladocera*. *Ecology* 72:924–937
- Mansour RA, Lipcius RN (1991) Density-dependent foraging and mutual interference in blue crabs preying upon infaunal clams. *Mar Ecol Prog Ser* 72:239–246
- Maszczyk P, Gliwicz ZM (2014) Selectivity by planktivorous fish at different prey densities, heterogeneities, and spatial scales. *Limnol Oceanogr* 59:68–78
- McMahon TE, Zale AV, Barrows FT, Selong J, Danehy R (2007) Temperature and competition between bull trout and brook trout: a test of the elevation refuge hypothesis. *Trans Am Fish Soc* 136:1313–1326
- Miller RS (1967) Pattern and process in competition. *Adv Ecol Res* 4:1–74
- Moody AL, Ruxton GD (1996) The intensity of interference varies with food density: support for behaviour-based models of interference. *Oecologia* 108:446–449
- Munk P, Kiørboe T (1985) Feeding behavior and swimming activity of larval herring *Clupea harengus* in relation to density of copepod nauplii. *Mar Ecol Prog Ser* 24:15–21
- Nakayama S, Fuiman LA (2010) Body size and vigilance mediate asymmetric interference competition for food in fish larvae. *Behav Ecol* 21:708–713
- Peckarsky BL (1991) Mechanisms of intra- and interspecific interference between larval stoneflies. *Oecologia* 85:521–529
- Persson L (1982) Rate of food evacuation in roach (*Rutilus rutilus*) in relation to temperature, and the application of evacuation rate estimates for studies on the rate of food consumption. *Freshwat Biol* 12:203–210
- Persson L (1986) Temperature-induced shift in foraging ability in two fish species, roach (*Rutilus rutilus*) and perch (*Perca fluviatilis*): implications for coexistence between poikilotherms. *J Anim Ecol* 55:829–939
- Ping X, Li C, Jiang Z, Liu W, Zhu H (2011) Interference competition and group size effect in sika deer (*Cervus nippon*) at salt licks. *Acta Ethol* 14:43–49

- Pitcher TJ, Magurran AE, Winfield IJ (1982) Fish in larger shoals find food faster. *Behav Ecol Sociobiol* 10:149–151
- Post JR, Parkinson EA, Johnston NT (1999) Density-dependent processes in structured fish populations: interaction strengths in whole-lake experiments. *Ecol Monogr* 69:155–175
- Rangeley RW, Kramer DL (1998) Density-dependent antipredation tactics and habitat selection in juvenile pollock. *Ecology* 79:943–952
- Roberts G (1996) Why individual vigilance declines as group size increases. *Anim Behav* 51:1077–1086
- Rutten AL, Oosterbeek K, van der Meer J, Verhulst S, Ens BJ (2010) Experimental evidence for interference competition in oystercatchers, *Haematopus ostralegus*. I. Captive birds. *Behav Ecol* 21:1251–1260
- Ruxton GD, Gurney WSC, de Roos AM (1992) Interference and generation cycles. *Theor Popul Biol* 42:235–253
- Sale PF (1972) Effect of cover on agonistic behavior of a reef fish: a possible spacing mechanism. *Ecology* 53:753–758
- SAS Institute Inc. (2013) SAS/STAT<sup>®</sup> 12.3 user's guide. SAS Institute Inc., Cary
- Scharf I, Filin I, Ovadia O (2008) An experimental design and a statistical analysis separating interference from exploitation competition. *Popul Ecol* 50:319–324
- Schoener TW (1983) Field experiments on interspecific competition. *Am Nat* 122:240–285
- Shaw J, Tregenza T, Parker GA, Harvey IF (1995) Evolutionarily stable foraging speeds in feeding scrambles: a model and an experimental test. *Proc R Soc Lond Biol* 260:273–277
- Sih A (1981) Stability, prey density and age-dependent interference in an aquatic insect predator, *Notonecta hoffmanni*. *J Anim Ecol* 50:625–636
- Smallegange IM, Van der Meer RH, Kurvers JM (2006) Disentangling interference competition from exploitative competition in a crab–bivalve system using a novel experimental approach. *Oikos* 113:157–167
- Steinwascher K (1978) Interference and exploitation competition among tadpoles of *Rana utricularia*. *Ecology* 59:1039–1046
- Stillman RA, Goss-Custard JD, Alexander MJ (2000) Predator search pattern and the strength of interference through prey depression. *Behav Ecol* 11:597–605
- Stillman RA, Poole AE, Goss-Custard JD, Caldow RWG, Yates MG, Triplet P (2002) Predicting the strength of interference more quickly using behaviour-based models. *J Anim Ecol* 71:532–541
- Sutherland WJ, Koene P (1982) Field estimates of the strength of interference between oystercatchers *Haematopus ostralegus*. *Oecologia* 55:108–109
- Thompson DJ (1978) Towards a realistic predator–prey model: the effect of temperature on the functional response and life history of larvae of the damselfly, *Ischnura elegans*. *J Anim Ecol* 47:757–767
- Triplet P, Stillman RA, Goss-Custard JD (1999) Prey abundance and the strength of interference in a foraging shorebird. *J Anim Ecol* 68:254–265
- Vahl WK, van der Meer J, Weissing FJ, van Dullemen D, Piersma T (2005) The mechanisms of interference competition: two experiments on foraging waders. *Behav Ecol* 16:845–855
- Wintzer AP, Motta PJ (2004) The effects of temperature on prey capture kinematics of bluegill (*Lepomis macrochirus*): implications for feeding studies. *Can J Zool* 82:794–799
- Wootton RJ (1990) Ecology of teleost fishes. Kluwer, Dordrecht